

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan studi eksperimental laboratorik *in vitro* dengan rancangan *Post Control Group Design* untuk membuktikan efek antimikroba ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *Shigella dysenteriae*. Jumlah perlakuan yang diberikan ada enam, yaitu satu control bakteri dan lima macam konsentrasi ekstrak daun binahong. Untuk mengetahui hal itu, akan dilakukan metode dilusi tabung (*Tube Dilution Test*). Metode ini terdiri atas dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan di media cair (*nutrient broth*) dengan tujuan untuk mencari seberapa besar Kadar Hambat Minimum (KHM), kemudian dilanjutkan dengan tahap penggoresan pada media NAP (*Nutrient Agar Plate*) yang ditujukan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari larutan tersebut dalam kaitannya dengan penghambatan pertumbuhan koloni *S. dysenteriae*.

4.2 Populasi dan sampel

4.2.1 Identifikasi dan batasan-batasan tentang subjek penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah isolat *Shigella dysenteriae* dengan cara pemilihan sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

4.2.2 Kriteria inklusi dan eksklusi

4.2.2.1 Kriteria inklusi

- Bakteri *Shigella dysenteriae* yang sudah resisten terhadap antibiotik ampisilin.

4.2.2.2 Kriteria eksklusi

- Bakteri *Shigella dysenteriae* yang belum resisten terhadap antibiotik ampisilin.

4.2.3 Prosedur dan teknik pengambilan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolate bakteri *S. dysenteriae* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Karakteristik bakteri *S. dysenteriae* yang digunakan, disesuaikan dengan kriteria inklusi dan eksklusi penelitian.

Ekstrak Daun binahong yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari Materia Medica Batu Malang.

4.2.4 Estimasi Jumlah Pengulangan

Dalam penelitian ini, banyaknya pengulangan yang dilakukan ditentukan berdasarkan perhitungan rumus Asti (2009) didapatkan pengulangan:

$$\{(t-1) - (r-1)\} \geq 10$$

$$\{(6-1) - (r-1)\} \geq 10$$

$$r - 1 \geq 10/5$$

$$r \geq 2 + 1$$

$$r \geq 3$$

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

r = jumlah pengulangan

Jadi, pada penelitian ini masing-masing perlakuan akan dilakukan tiga kali pengulangan.

4.3 Variabel penelitian

4.3.1 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan *S. dysenteriae* yang tumbuh pada media NAP.

4.3.2 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun binahong (11,5%, 12,5%, 13,5%, 14,5%, 15,5%, 0%), dosis tersebut didapatkan berdasarkan eksplorasi awal atau penelitian pendahuluan (Bab 6).

4.4 Lokasi dan waktu penelitian

4.4.1 Lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.4.2 Waktu penelitian

Bulan Oktober hingga November 2013.

4.5 Alat dan Bahan penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk pembuatan Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

- Blender untuk menghaluskan daun binahong
- Kertas saring untuk membungkus serbuk daun binahong
- Gelas ekstraksi
- Seperangkat evaporator vakum
- Alat pemanas air
- Labu penampung hasil evaporasi
- Rotary evaporator
- Tabung pendingin dan pompa sirkulasi air dingin
- Bak penampung air dingin
- Pompa vakum
- Tabung penampung metanol
- Batu didih
- Cawan penguap
- Neraca analitik
- Daun binahong

- Metanol 96%
- Aquades

4.5.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

- Ose lurus, ose lengkung
- Kertas penghisap, minyak emersi
- Mikroskop
- Tabung reaksi
- Lampu spiritus
- Isolat *S. dysenteriae*
- Pewarna Gram (Kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin)
- Kit *microbact test*
- *Mineral oil* (MB1093A)
- Inkubator

4.5.3 Alat dan Bahan untuk tes kepekaan Bakteri

- Cakram kertas saring
- Inkubator
- Lampu spiritus
- Label
- Medium NAP
- Perbenihan cair bakteri *S. dysenteriae*
- Bahan antimikroba (Ampisilin)

4.5.4 Alat dan Bahan untuk uji Dilusi Tabung

- Tabung reaksi
- Pipet steril ukuran 1 ml dan 10 ml
- Karet penghisap
- Inkubator
- Vortex
- Busen (lampu spiritus)
- Korek api
- Gelas objek

- *Plate* kosong dan steril
- Alat penjepit (*scapel*) steril
- Kapas
- Ekstrak daun binahong
- Perbenihan cair yang distandarisasikan
- *Colony counter*

4.6 Definisi Operasional

- *Isolate Shigella dysenteriae* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, yang sebelumnya sudah diuji sensitivitasnya, dan terbukti telah resisten terhadap ampisilin. *Isolate Shigella dysenteriae* yang digunakan hanya dari 1 isolat yang akan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.
- Ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari Materia Medica Batu Malang.
- Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji (*S. dysenteriae*) pada medium agar, ditandai dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih pada ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang telah diberi bakteri uji tersebut di dalam *broth*.
- Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis), ditandai oleh tidak adanya pertumbuhan koloni kuman pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP) yang telah dilakukan *streaking* dengan satu ose ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)
- Kontrol positif (kontrol kuman) adalah tabung uji dengan konsentrasi 0% ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis), yang digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri lain. Kontrol positif berasal dari larutan bakteri uji yang telah distandarisasi dengan standar McFarland 0,5 sebanyak 2 ml.

- Pengamatan kualitatif dilakukan dengan cara mengamati kekeruhan pada tabung uji dengan larutan yang terdiri dari konsentrasi larutan yang berbeda, larutan *broth* bakteri, dan aquades serta kontrol kuman
- Pengamatan kuantitatif dilakukan dengan cara menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada NAP dengan *Colony counter*

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan alat (Nuri *et al*, 2008)

Semua alat yang akan dipakai dalam penelitian ini disterilkan dalam sterilisator panas kering selama 15 menit dengan suhu 110°C terlebih dahulu. Bahan media disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit dengan suhu 121°C.

4.7.2 Pembuatan ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis)

4.7.2.1 Proses Ekstraksi

- Cuci bersih 1 kg daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang akan dikeringkan dengan diangin-anginkan sampai kering (bebas kandungan air)
- Setelah kering akan didapatkan daun binahong yang berkurang beratnya menjadi sekitar 300-450 gram karena kandungan airnya telah hilang
- Haluskan daun tersebut dengan blender sehingga bentuknya menyerupai serbuk, kemudian timbang dan ambil serbuk daun binahong tersebut sebanyak 100 gram
- Kemudian masukkan 100 gram bubuk daun binahong tersebut kedalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter lalu rendam dengan methanol 96% sampai volume 900 ml
- Kocok sampai benar-benar tercampur, kurang lebih 30 menit dan diamkan satu malam sampai mengendap
- Setelah satu malam, ambil lapisan atas campuran methanol 96% dengan zat aktif yang sudah terambil dan lanjutkan pada proses evaporasi.

4.7.2.2 Proses evaporasi

- Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja percobaan, dengan susunan dari bawah ke atas: alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator*, dan tabung pendingin spiral
- Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu penampung sedangkan *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan
- Pemanas aquades juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih dengan suhu 70°C (sesuai titik didih methanol 96%) dan methanol 96% mulai menguap
- Hasil penguapan methanol 96% dikondensasikan menuju labu penampung methanol 96% sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum
- Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah kental evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian dioven selama 2 jam pada suhu 70°C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstraksi 100%

4.7.3 Identifikasi Bakteri *Shigella dysenteriae* (WHO, 2007)

Dilakukan pemurnian bakteri terlebih dahulu dengan menanam bakteri yang diduga *S. dysenteriae* pada NAP, diinkubasikan dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Dilakukan uji ulang, masing-masing dilakukan dengan pewarnaan gram, dan *microbact test*. Masing-masing uji ulang adalah sebagai berikut:

4.7.3.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan Gram:

- 1) Satu ose bakteri dari biakan cair diletakkan pada *object glass* ditunggu hingga kering
- 2) Difiksasi dengan memberikan pemanasan secukupnya
- 3) Diberi larutan Kristal violet, diamkan 1 menit

- 4) Dibilas dengan air yang mengalir
- 5) Diberi larutan lugol, diamkan 1 menit
- 6) Dibilas dengan air yang mengalir
- 7) Diberi larutan alkohol 96% selama 5-10 detik
- 8) Dibilas dengan air yang mengalir
- 9) Diberi larutan safranin, diamkan 30 detik
- 10) Dibilas dengan air yang mengalir
- 11) Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif 100x
- 12) Dicari adanya sel bakteri bersifat Gram negatif, berbentuk batang ramping

4.7.3.2 Microbact Test

Prosedur *microbact test*:

- Kultur isolat yang sudah diinkubasi selama 18-24 jam untuk diidentifikasi
- Lakukan *oxidase test* untuk menentukan kit yang digunakan
- Pilih 1 hingga 3 koloni isolat dan buat menjadi mulsi dalam salin
- Tempatkan *strip test* atau *microplate* pada penampakan dan lepaskan segel dibelakangnya
- Tambah 4 tetes suspensi bakteri pada setiap dinding
- Tambah 2 tetes mineral oil (MB1093A) pada setiap dinding berwarna hitam
- Tutup ulang segel dan inkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 jam
- Setelah diinkubasi, tambahkan *reagents* yang tepat (Tabel 4.1)
- Catat hasil pada *report forms* dan interpretasikan menggunakan paket identifikasi Microbact™

Sistem	Dinding	Reagent	Kuantitas	Waktu untuk baca
12A (12E)/ 24E	8	Indole	2 tetes	2 menit
12A (12E)/ 24E	10	VPI & VPII	Tiap 1 tetes	15-30 menit
12A (12E)/ 24E	12	TDA	1 tetes	Immediately

Tabel 4.1 Tambahan reagents untuk sistem identifikasi Microbact™
Gram-negative

4.7.4 Uji Kepekaan *Shigella dysenteriae* Terhadap Ampisilin

4.7.4.1 Metode difusi cakram

Prosedur metode difusi cakram:

- Cakram kertas saring yang mengandung bahan antimikroba (ampisilin) yang telah ditentukan kadarnya
- Cakram tersebut kemudian ditempatkan pada media padat yang telah diberi bakteri uji (*S.dysenteriae*)
- Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam
- Setelah diinkubasi, diameter area hambatan dihitung sebagai daya hambat obat terhadap bakteri uji (*S.dysenteriae*)
- Area hambatan yang terbentuk ditunjukkan sebagai daerah yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan bakteri di sekitar cakram kertas saring

4.7.5 Pembuatan larutan Bakteri Uji (Bailey and Scott's, 1994)

Perbenihan cair bakteri *S. dysenteriae* pada *Nutrient broth* diukur kekeruhannya dengan McFarland 0,5 yang telah distandarisasi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 625 nm dengan OD 0,1. Yang berarti bahwa McFarland 0,5 setara dengan jumlah bakteri $(1,0-1,5) \times 10^8$ CFU/ml.

Dari konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml dilakukan pengenceran dengan menambahkan 1 ml perbenihan (10^8 CFU/ml) ke dalam 9 ml *Nutrient broth* 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.

4.7.6 Pengujian bahan

1. Disediakan 6 tabung reaksi steril, 1 tabung sebagai kontrol kuman (KK) dan 5 tabung sebagai uji antimikroba.

2. Ekstrak daun binahong (dalam bentuk cairan) dimasukkan pada tabung reaksi steril masing-masing yaitu dengan konsentrasi: 0ml; 0,23ml; 0,25ml; 0,27ml; 0,29ml; dan 0,31ml.
3. Aquades steril dimasukkan pada masing-masing tabung, yaitu: 1ml; 0,77ml; 0,75ml; 0,73ml; 0,71ml; dan 0,69ml.
4. Konsentrasi awal larutan ekstrak daun binahong tabung 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 berturut-turut menjadi 0%, 23%, 25%, 27%, 29%, dan 31%.
5. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi bakteri 1×10^6 CFU/ml.
6. Perbenihan cair bakteri dimasukkan pada semua tabung konsentrasi, masing-masing sebanyak 1 ml. Sehingga konsentrasi akhir ekstrak daun binahong adalah sebagai berikut: 0%; 11,5%; 12,5%; 13,5%; 14,5%; dan 15,5%.
7. Masing-masing tabung divorteks dan diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
8. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. Akan didapatkan KHM dengan cara melihat kejernihan tabung.
9. Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil 1 ose dan dilakukan *streaking* sebanyak 0,01 ml pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP). Kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C.
10. 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.

4.8 Analisis data

Data yang diperoleh yaitu data konsentrasi ekstrak metanol daun binahong dan jumlah koloni bakteri *S. dysenteriae*. Analisis yang digunakan adalah uji *One-Way ANOVA* karena dalam penelitian ini data yang digunakan adalah data numeric serta memiliki satu variabel dependen (jumlah koloni bakteri *S. dysenteriae*) dan satu variabel independen dengan beberapa kelompok dengan satu faktor pembeda (konsentrasi akhir ekstrak daun binahong), serta menggunakan taraf kepercayaan 95% ($\alpha > 0,05$) dan uji korelasi bivariat dengan

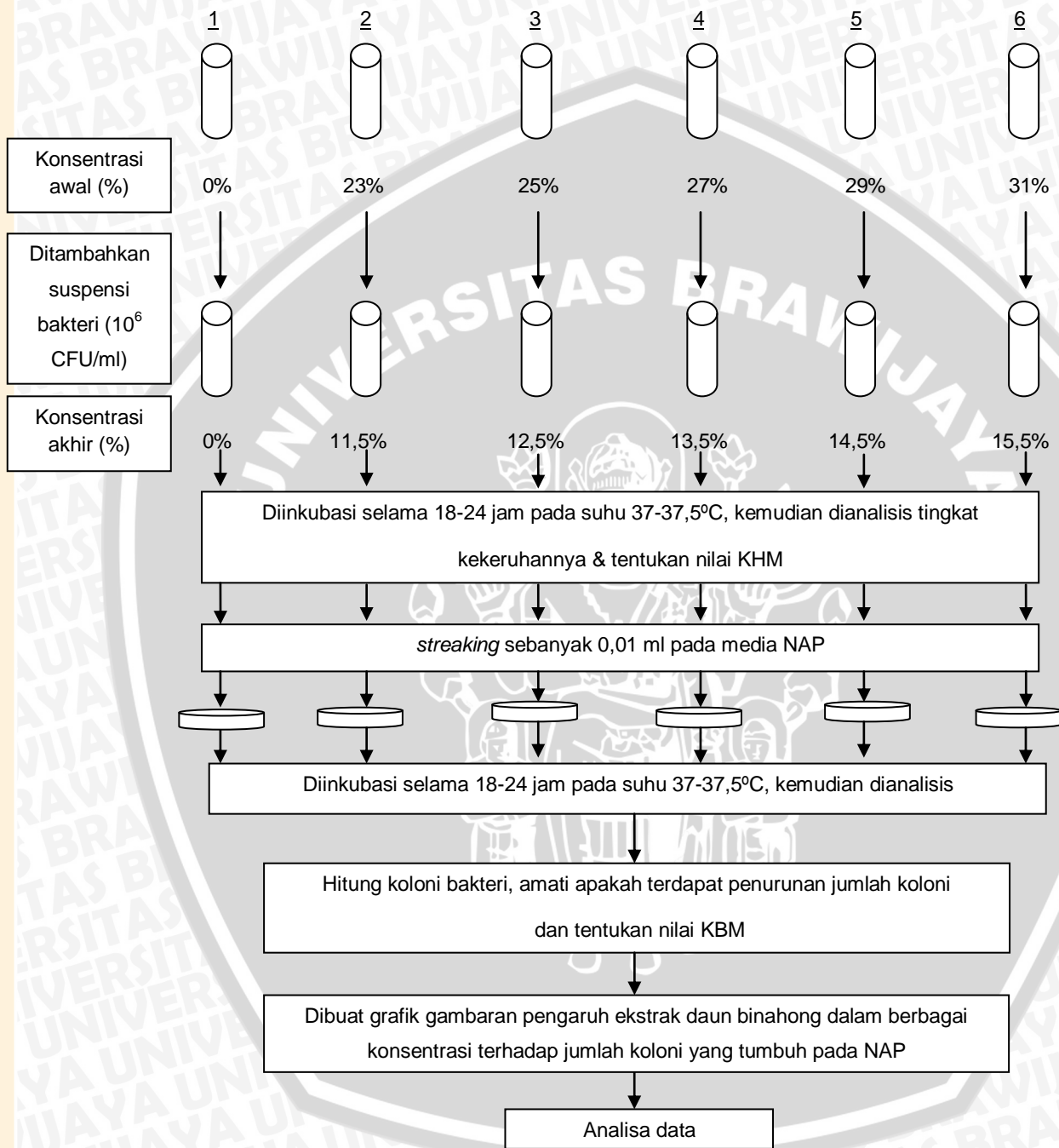
menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for windows version 17.0. Langkah-langkah dalam analisis data antara lain (Dahlan, 2008):

1. Pengujian syarat ANOVA, yaitu:
 - a. Data berdistribusi normal (sebaran data normal)
 - b. Varian data sama (homogeny atau *Equal Variances*)

Bila tidak memenuhi syarat, maka dilakukan upaya transformasi data agar sebaran data menjadi normal dan varian data menjadi sama. Bila sebaran dan varian data menjadi sama maka dilanjutkan dengan uji ANOVA, namun jika tetap tidak sama maka alternatif yang dipilih adalah uji *Kruskall-Wallis*

2. Uji *One-Way* ANOVA, untuk mengetahui adanya perbedaan jumlah koloni *S. dysenteriae* pada setiap konsentrasi ekstrak daun binahong. Bila syarat ANOVA tidak terpenuhi, dilakukan uji *Kruskall-Wallis*
3. Uji *Post Hoc Test (Tukey Test)*, untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun binahong mana saja yang menyebabkan jumlah koloni *S. dysenteriae* cenderung tidak berbeda dan berbeda nyata. Bila sebelumnya dilakukan uji *Kruskall-Wallis*, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc (Tamhane's T2)*
4. Uji Korelasi, untuk mengetahui kekuatan hubungan pemberian ekstrak daun binahong terhadap jumlah koloni *S. dysenteriae*
5. Uji Regresi, untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun binahong pada setiap konsentrasi terhadap jumlah koloni *S. dysenteriae*.

4.9 Alur kerangka kerja penelitian



Gambar 4.1 Alur kerangka kerja penelitian