

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *true experiment* dengan menggunakan metode dilusi tabung dan dilusi agar. Desain penelitian yang digunakan adalah *post test only control* yang merupakan desain penelitian yang tidak menggunakan ukuran yang diperoleh dari *pretest* untuk menetapkan sebuah patokan. Desain penelitian ini terdiri dari dua kelompok yaitu kelompok yang diberi perlakuan dan kelompok kontrol. Kedua kelompok tersebut, kelompok yang diberi perlakuan dan kelompok kontrol, dianggap terdistribusi secara merata (Marczyk *et al.*, 2005).

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel yang digunakan adalah isolat bakteri *Streptococcus pyogenes* No. LKS07 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus berikut ini (Loekito, 1998):

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

p = perlakuan (konsentrasi 5 level)

n = jumlah sampel

15 = nilai konstanta

Berdasarkan penghitungan dengan rumus estimasi besar sampel didapatkan bahwa untuk lima jenis perlakuan, diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit 4 kali untuk masing-masing perlakuan.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- a. Variabel bebas yaitu ekstrak etanol rimpang jahe merah.
- b. Variabel terikat yaitu pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* .
- c. Variabel kendali yaitu waktu dan suhu pada saat inkubasi. Waktu yang digunakan adalah 18-24 jam dan suhu yang digunakan adalah 37°C.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan September 2013-Januari 2014.

4.5 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk melakukan ekstraksi rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) adalah rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*), etanol 96%, labu Erlenmeyer, *vacuum evaporator*, timbangan analitik, gelas ukur, kertas saring, dan shaker. Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk identifikasi bakteri adalah isolat bakteri, bahan pewarnaan gram (Kristal Violet, Lugol, Alkohol, dan Safranin), BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*), BAP (*Blood Agar Plate*), cakram basitrasin, *object glass*, minyak emersi, dan mikroskop. Alat dan bahan yang digunakan dalam metode dilusi tabung adalah tabung reaksi dengan label konsentrasi, tabung reaksi untuk kontrol bakteri dan ekstrak, pipet steril, inkubator, hasil ekstraksi, perbenihan cair bakteri

dengan kepadatan 10^6 CFU/ml, aquades, dan *vortex*. Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk *streaking plate* adalah BHIA, ose, Bunsen, dan *vortex*. Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan bahan cair bakteri dengan kepadatan 10^6 CFU/ml adalah tabung reaksi, MH Broth, pipet steril, larutan NaCl, *vortex*, dan spektrofotometer.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah :

- Rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) yang digunakan adalah rimpang jahe merah tua yang diperoleh di UPT Materia Medica, Batu, Malang.
- Ekstrak etanol rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) adalah ekstrak yang diperoleh dari rimpang jahe merah tua yang telah dikeringkan, kemudian dihaluskan, direndam dalam etanol 96%, diaduk, didiamkan, dan diambil filtratnya dengan penyaringan yang kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 60°C .
- *Streptococcus pyogenes* No. LKS07 adalah bakteri gram positif berbentuk bulat atau rantai panjang dari Laboratorium Kesehatan Surabaya pada tahun 2007.
- Kadar Hambat Minimum (KHM) metode dilusi tabung adalah konsentrasi antimikroba ekstrak etanol rimpang jahe merah terendah yang mampu menghambat bakteri *Streptococcus pyogenes*, ditandai dengan hasil biakan tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba), setelah diinkubasikan 18-24 jam dan dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif.

- Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi antibakteri ekstrak etanol rimpang jahe merah terendah yang mampu membunuh bakteri *Streptococcus pyogenes*, ditandai dengan tidak tumbuhnya koloni mikroba yang ditanam pada perbenihan padat.
- KHM (Kadar Hambat Minimum) pada metode dilusi agar adalah konsentrasi dimana mulai tidak terlihat adanya pertumbuhan koloni bakteri pada medium agar secara kasatmata (Forbes, 2007).
- *Original Inoculum* (OI) adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang kemudian sebelum diinkubasi di-*streaking* pada media agar padat dan digunakan untuk mencari nilai KBM .

4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur yang dilakukan dalam penelitian ini adalah :

1. Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Jahe Merah
Langkah-langkah pembuatan ekstrak etanol rimpang jahe merah adalah sebagai berikut :
 - a. Sejumlah rimpang jahe merah dicuci bersih, diiris atau dipotong kecil-kecil, kemudian dijemur atau dikeringkan di bawah sinar matahari.
 - b. Rimpang jahe yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender.
 - c. Rimpang jahe merah yang sudah halus tersebut kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik dan diambil sebanyak 100 gram lalu dibungkus kertas saring dan dimasukkan kedalam tabung ekstraktor *soxhlet*.
 - d. Kemudian ke dalam tabung tersebut dimasukkan pelarut etanol 96% dan dimasukkan ke dalam labu.

- e. Selanjutnya labu yang telah berisi pelarut etanol pada suhu medium dipanaskan sampai mendidih.
- f. Diamati proses terjadinya sirkulasi kontinu pelarut etanol hingga semua ekstrak dianggap telah terekstraksi. Kemudian hasil ekstraksi siap untuk dievaporasi.
- g. Diambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif rimpang jahe merah yang sudah terlarut, lalu dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter.
- h. Selanjutnya labu evaporasi dipasang pada evaporator dan *water bath* diisi dengan air sampai penuh.
- i. Kemudian semua rangkaian alat dipasang, termasuk *rotary evaporator* dan pemanas *water bath*, diatur hingga suhu 80°C sesuai titik didih etanol.
- j. Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol agar tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.
- k. Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah kental, evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil.
- l. Hasil ekstrak rimpang jahe merah yang didapatkan adalah berupa cairan kental berwarna merah bata pekat dan dianggap sebagai konsentrasi 100%.

2. Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan dengan sejumlah tes yang terdiri atas pewarnaan gram, tes hemolitik, tes katalase, dan tes cakram basitrasin.

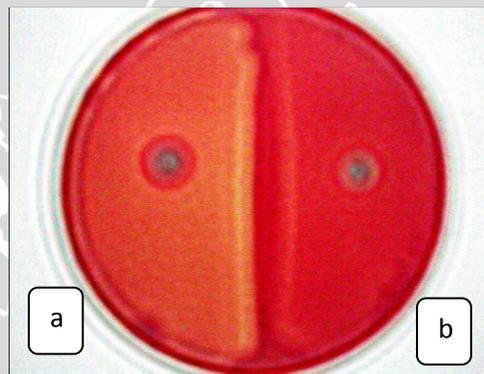
Pewarnaan gram bertujuan untuk membedakan bakteri gram positif dan negatif. Tes hemolitik bertujuan untuk menentukan sifat hemolisis dari bakteri. Tes katalase bertujuan untuk mengetahui bakteri tersebut menghasilkan gelembung udara atau tidak. Pada bakteri *Streptococcus* tidak terdapat gelembung udara atau katalase negatif. Tes cakram basitrasin bertujuan untuk membedakan bakteri uji dengan bakteri *streptococcus* lainnya yaitu bakteri *streptococcus* lain yang ada dalam grup β -hemolitik. Koloni *Streptococcus pyogenes* yang sangat kecil akan menghasilkan zona hambat di sekitar cakram basitrasin dengan diameter > 15 mm.

Pada pewarnaan gram untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut :

- a. Object glass dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak. Biarkan menjadi dingin.
- b. Sediaan apusan bakteri *Streptococcus pyogenes* dibuat pada object glass dengan ketebalan yang cukup (tidak terlalu tebal, juga tidak terlalu tipis). Setelah mengering di udara, apusan difiksasi dengan cara dilewatkan di atas api Bunsen sebanyak tiga kali.
- c. Sediaan dituangi dengan larutan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- d. Sediaan dituangi dengan Lugol selama 1 menit. Sisa Lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan dituangi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.

- f. Sediaan dituangi dengan Safranin selama 30 detik. Sisa Safranin dibuang dan dibilas dengan air.

Pada tes cakram basitrasin media BAP yang sebelumnya telah diinokulasikan bakteri ditemplei cakram basitrasin. Koloni bakteri yang bersifat β -hemolitik akan menghasilkan zona inhibisi di sekitar cakram yang ditunjukkan seperti yang ditunjukkan pada gambar 4.1. Zona inhibisi disebut juga zona hemolisis di mana pada zona ini tidak ditemukan sel darah merah sama sekali. Zona ini terjadi disebabkan adanya streptolisin yang dihasilkan oleh streptokokus.



Gambar 4.1 *Streptococcus pyogenes* (a) dan *Streptococcus mutans* (b) dalam media BAP pada tes cakram basitrasin (Samaranayake, 2007).

3. Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri Dengan Kepadatan 10^6 bakteri/ml

Suspensi bakteri pada MH Broth dispektrofotometri dengan $\lambda=625$ sehingga diketahui *Optical Density* (OD) yang setara dengan 10^8 bakteri/ml. Kemudian dengan rumus pengenceran $N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$, kepadatan bakteri tersebut diencerkan 2X dengan NaCl menjadi 10^6 bakteri/ml (Murray *et al.*, 1999).

4. Pengujian Efek Antibakteri dengan Metode Dilusi Tabung

Langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut :

- a. Disiapkan tujuh buah tabung reaksi. Lima tabung digunakan untuk uji antibakteri, satu tabung digunakan untuk kontrol bakteri (hanya diberi bakteri dan tidak diberi ekstrak), dan satu tabung digunakan untuk kontrol bahan (hanya diberi ekstrak dan tidak diberi bakteri).
- b. Hal yang pertama dilakukan adalah mencari dosis dengan penelitian eksplorasi. Setiap tabung (tabung 1 sampai dengan tabung 5) diisi sediaan ekstrak etanol rimpang jahe merah dengan konsentrasi 75%, 80%, 85%, 90%, dan 95%.
- c. Ke dalam masing-masing tabung ditambahkan perbenihan cair bakteri yang berisi 10^6 CFU/ml. Tabung yang berisi 0 ml ekstrak merupakan kontrol bakteri. Perbenihan cair bakteri dimasukkan pada semua tabung konsentrasi di atas, masing-masing sebanyak 1 ml, kecuali pada tabung kontrol bahan tidak dimasukkan perbenihan bakteri.
- d. Tabung yang berisi kontrol bakteri digoreskan pada medium BHIA sebagai original inoculums kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam.
- e. Masing-masing tabung di-*vortex* dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam.
- f. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung
- g. Perlakuan yang sama dilakukan pada *streaking plate* yang menggunakan medium agar padat (BHIA). Dari masing-masing tabung dilusi, diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada BHIA. Disiapkan 6 buah cawan petri yang diberi medium BHIA. Bakteri

diinokulasikan pada masing-masing medium dengan menggosokkan satu ose pada masing-masing cawan petri. Kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C.

- h. 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 BHIA atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di OI.

5. Pengujian Efek Antibakteri dengan Metode Dilusi Agar

Langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut :

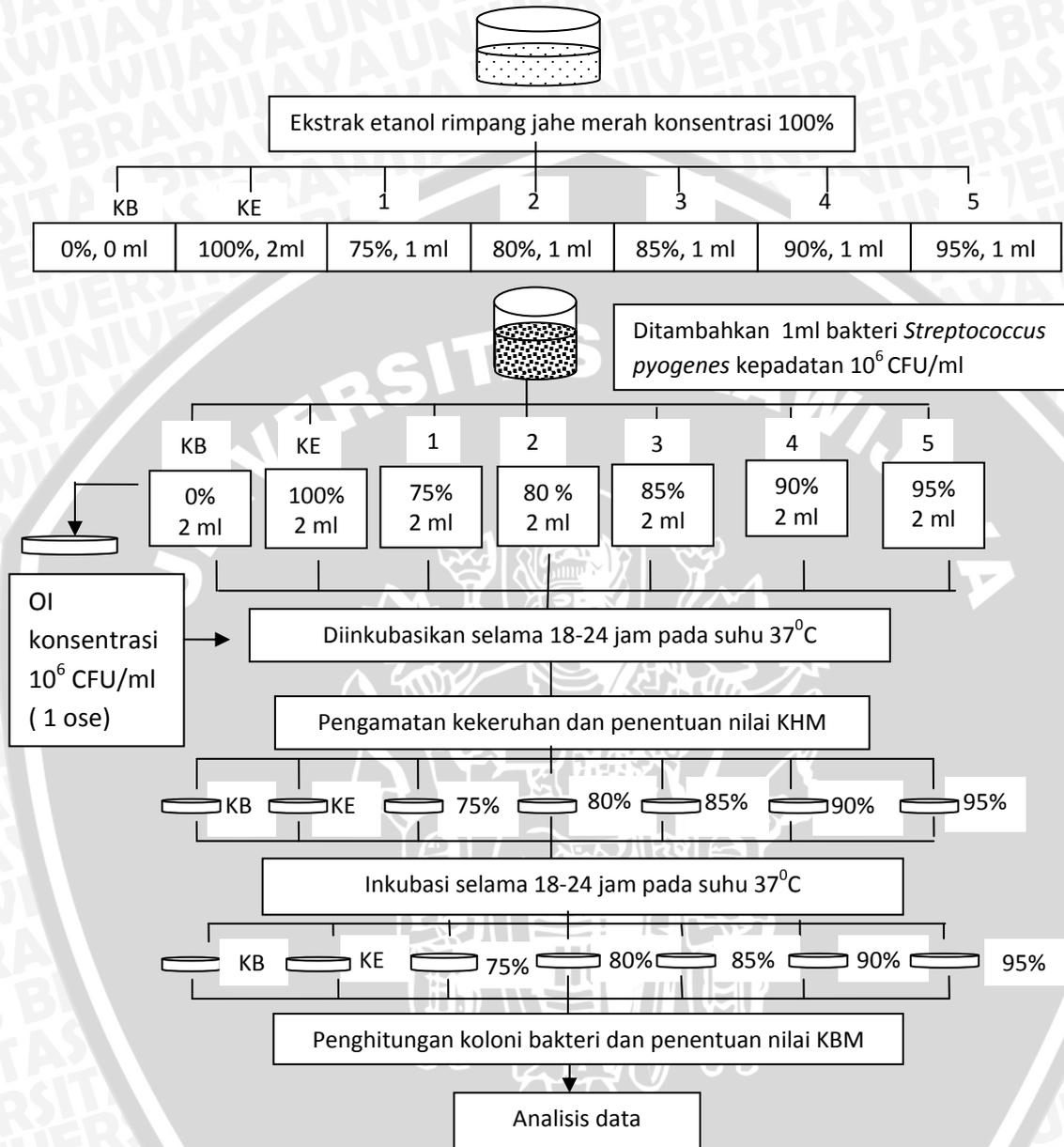
- a. Menyediakan 6 plate steril berdiameter 9 cm, 5 plate sebagai uji antibakteri dan 1 plate sebagai kontrol kuman. Konsentrasi yang digunakan adalah 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%.
- b. Volume total yang digunakan pada setiap plate untuk mencampur agar dengan ekstrak adalah 15 ml.
- c. Plate 1 (KK) : 15 ml agar tanpa penambahan ekstrak etanol rimpang jahe merah (kontrol kuman)
- d. Plate 2 (1%) : ekstrak etanol rimpang jahe merah konsentrasi 100% sejumlah 0,15 ml ditambah 14,85 ml agar
- e. Plate 3 (2%) : ekstrak etanol rimpang jahe merah konsentrasi 100% sejumlah 0,3 ml ditambah 14,7 ml agar
- f. Plate 4 (3%) : ekstrak etanol rimpang jahe merah konsentrasi 100% sejumlah 0,45 ml ditambah 14,55 ml agar
- g. Plate 5 (4%) : ekstrak etanol rimpang jahe merah konsentrasi 100% sejumlah 0,6 ml ditambah 14,4 ml agar

- h. Plate 6 (5%) : ekstrak etanol rimpang jahe merah konsentrasi 100% sejumlah 0,75 ml ditambah 14,25 ml agar
- i. Setelah agar dingin, setiap plate dibagi 4. Pada setiap kuadran ditetesi bakteri uji, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- j. Semua plate dikeluarkan dari inkubator. KHM ditentukan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri secara kasat mata.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



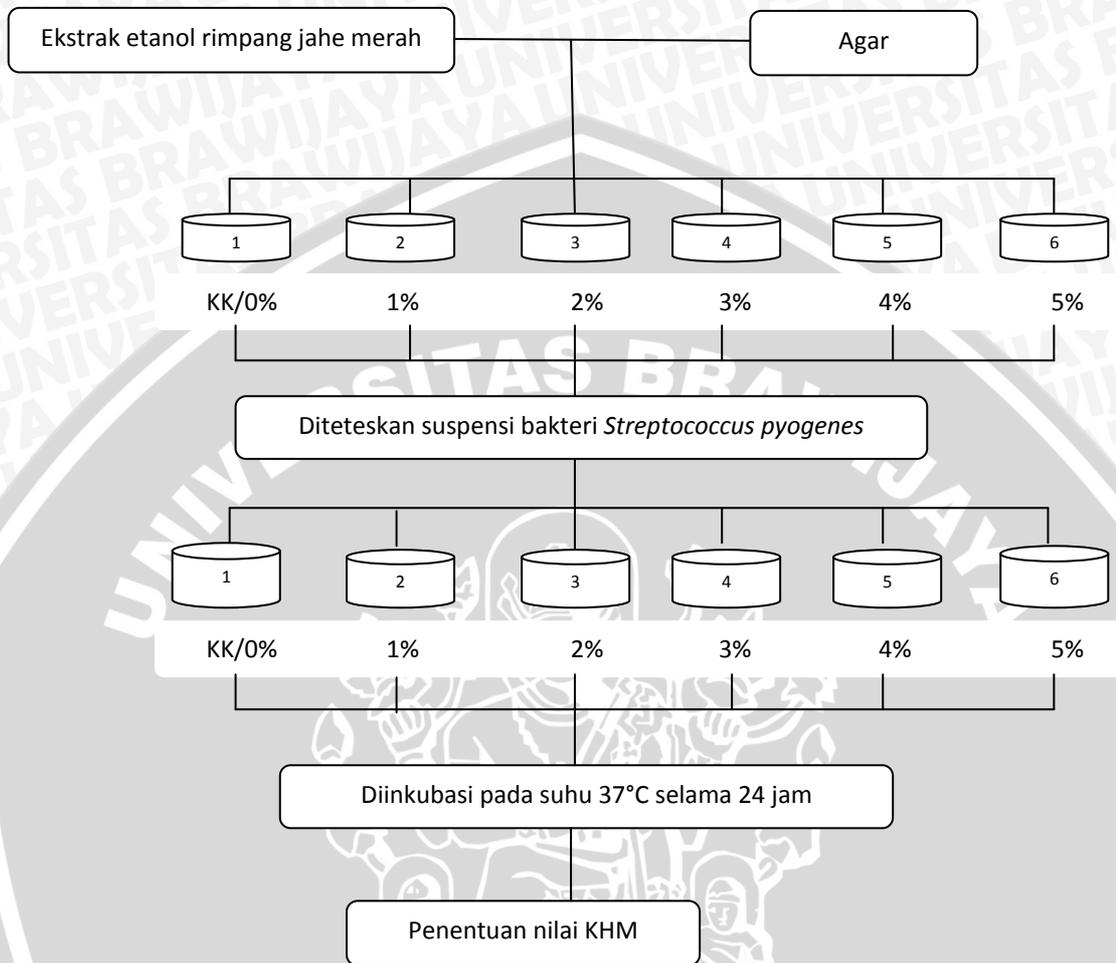
6. Kerangka Alur Penelitian dengan Metode Dilusi Tabung



Keterangan

- CFU : Colony Forming Unit
- KB : Kontrol bakteri *S. pyogenes*
- KE : Kontrol Ekstrak
- OI : Original inoculum dengan kepadatan 10^6 CFU/ml dengan penggoresan 1 ose
K 75%, K 80%, K 85%, K 90%, K 95%

7. Kerangka Alur Penelitian dengan Metode Dilusi Agar



Keterangan

KK : Kontrol Kuman

Data yang diperoleh berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif didapatkan dengan cara melihat tingkat kekeruhan tabung yang berisi ekstrak etanol rimpang jahe merah dan koloni bakteri. Data kuantitatif didapat dengan cara menghitung jumlah koloni dengan menggunakan *colony counter*.

4.8 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi dan homogenitas varian menggunakan tes Kolmogorov Smirnov. Apabila data terdistribusi normal,

analisis data yang digunakan adalah uji statistik *One-Way ANOVA*, uji statistik *Post Hoc Tukey* (uji Tukey HSD) dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *One-Way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol rimpang jahe merah terhadap pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*. Kemudian dilanjutkan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan antarkelompok perlakuan. Uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui besarnya pengaruh peningkatan konsentrasi ekstrak terhadap jumlah koloni *Streptococcus pyogenes*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 16.0.

