

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik. Uji antimikroba secara *in vitro* dengan menggunakan uji dilusi tabung test untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa*) sebagai antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*. Proses ekstraksi daun srikaya menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Sedangkan pengujian ekstrak etanol daun srikaya sebagai antimikroba menggunakan metode dilusi tabung. Metode dilusi tabung meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada media *broth* yang bertujuan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan tahap penanaman pada medium NAP (*Nutrient Agar Plate*) dengan metode penggoresan untuk menentukan KBM (Kadar Bunuh Minimal).

#### 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan November sampai Januari 2014.

#### 4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa*). Pembuatan ekstrak etanol daun srikaya dilakukan di laboratorium Polinema Malang dan menggunakan bakteri uji yaitu *S. aureus*

yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.4 Pengulangan dan Besar Sampel

Banyaknya jumlah isolat yang diperlukan yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Solimun, 2001) :

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

Keterangan :

P = jumlah perlakuan (terdiri dari 6 macam perlakuan)

N = jumlah ulangan yang diperlukan

Penelitian ini menggunakan 6 konsentrasi (A, B, C, D, E, F) dari ekstrak etanol daun srikaya dan 1 kontrol *Staphylococcus aureus* tanpa diberi ekstrak etanol daun srikaya (kontrol bakteri) ( $p = 6 + 1 = 7$ ) maka didapatkan jumlah pengulangan :

$$7 (n - 1) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$N \geq 3,1 \approx 4$$

Berdasarkan perhitungan diatas, maka pada penelitian ini masing-masing perlakuan dilakukan empat kali pengulangan.

#### 4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari dua macam yaitu variabel bebas dan variabel tergantung.

#### 4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas (*independent variable*) adalah konsentrasi ekstrak etanol daun srikaya yang dibuat dalam konsentrasi awal 32,5%, 30%, 27,5%, 25%, 22,5%, 20%, 0%. Besarnya konsentrasi ekstrak daun srikaya (*Annona squamosa*) yang digunakan didapatkan dari penelitian pendahuluan.

#### 4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel Tergantung (*dependent variabel*) adalah tingkat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yaitu dengan melihat kekeruhan pada tabung untuk menentukan KHM dan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada Nutrient Agar Plate untuk menentukan KBM.

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Daun Srikaya yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari daerah Malang.
2. Sediaan ekstrak etanol daun srikaya yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan pelarut etanol 96% dan dibuat dengan menggunakan metode maserasi dari daun srikaya. Pembuatan ekstrak menggunakan 100 gram serbuk daun srikaya yang bila diekstrak dengan etanol 96% akan didapatkan sekitar 20 ml ekstrak dengan konsentrasi 100%.
3. *Staphylococcus aureus* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* yang dimiliki oleh laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. *Staphylococcus aureus* berdiameter sekitar 1 $\mu$ m tersusun dalam kelompok yang tidak teratur, dengan pewarnaan, gram bersifat gram positif, pewarnaan

yang berasal dari perbenihan cair bisa terlihat bentukan kuman yang lepas sendiri-sendiri, berpasangan atau rantai pendek, untuk membiakan *Staphylococcus* diperlukan suhu optimal antara 28<sup>o</sup> – 38<sup>o</sup> C, pH optimal untuk pertumbuhan *Staphylococcus aureus* adalah 7,4.

4. Uji kepekaan antimikroba adalah uji sensitivitas dan efektivitas suatu antimikroba dalam melawan mikroba patogen.
5. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol daun srikaya yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *Staphylococcus aureus*. Ditandai dengan tidak terdapatnya kekeruhan pada larutan ekstrak etanol daun srikaya yang telah diberi bakteri uji tersebut.
6. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol daun srikaya yang mampu membunuh bakteri uji *Staphylococcus aureus*. Ditandai oleh jumlah koloni pada medium agar padat yang telah dilakukan *streaking* dengan menggunakan ose dengan diameter 5mm dan volume 0,01ml larutan ekstrak etanol daun srikaya yang telah diberi bakteri uji tersebut, dengan tidak adanya jumlah koloni bakteri lagi.
7. Kontrol bakteri adalah biakan *Staphylococcus aureus* murni yang tidak dicampur dengan ekstrak etanol daun srikaya yang digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri lain.

8. Pengamatan kuantitatif digunakan untuk menentukan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara kuantitatif dengan cara menghitung koloni bakteri uji menggunakan *colony counter*.

#### 4.7 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.7.1 Alat Pembuatan Ekstrak Daun Srikaya

Alat yang dibutuhkan untuk membuat ekstrak daun srikaya, antara lain :

1. Blender
2. Kertas saring
3. Gelas ekstrasi
4. Seperangkat evaporator vakum
5. Alat pemanas air
6. Labu penampung hasil evaporasi
7. Rotary evaporator
8. Tabung pendingin dan pompa sirkulasi air dingin
9. Bak penampung air dingin
10. Pompa vakum
11. Tabung penampung etanol
12. Batu didih
13. Cawan penguap
14. Neraca analitik

##### 4.7.2 Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Srikaya

1. Daun srikaya 2kg
2. Etanol 96%
3. Aquades

#### 4.7.3 Alat Untuk Identifikasi dan Tes Kepekaan Bakteri

1. Cawan petri
2. Ose (dengan diameter 5mm dan volume 0,01ml)
3. Tabung reaksi
4. Labu elenmeyer
5. Termometer
6. Inkubator
7. Gelas obyek
8. Bunsen
9. Korek api
10. Spidol permanen
11. Pipet steril 10 ml
12. Mikroskop
13. Penggaris
14. Kapas steril
15. *Colony counter*

#### 4.7.4 Bahan Untuk Identifikasi dan Tes Kepekaan Bakteri

1. Isolat *Staphylococcus aureus*
2. *Nutrient broth* (NB)
3. Medium NAP
4. Aquades
5. Pewarnaan gram (Kristal Violet, Lugol, alkohol 96%, safranin)
6. Minyak emersi
7. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%

#### 4.7.5 Alat dan Bahan Untuk Uji Dilusi Tabung

1. Tabung reaksi
2. Pipet steril ukuran 1 ml
3. Karet penghisap
4. Inkubator
5. Ekstrak daun turi merah
6. Vortex
7. Pembenihan cairan yang distandarisasikan (NaCl, *Broth*)
8. Bunsen (lampu spiritus)
9. Korek api
10. Gelas objek
11. Plate kosong dan steril
12. Alat penjepit (*scalpel*) steril
13. Kapas
14. NAP
15. *Colony counter*

(lampiran 1)

#### 4.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi pembuatan ekstrak etanol daun srikaya, identifikasi bakteri uji (*Staphylococcus aureus*), persiapan suspensi uji *Staphylococcus aureus*, dan uji antimikroba ekstrak etanol daun srikaya.

##### 4.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun Srikaya

Pembuatan ekstrak etanol daun srikaya dimulai dengan persiapan sampel daun srikaya kering, dilanjutkan pembuatan sediaan ekstrak etanol daun srikaya yang terdiri atas proses ekstraksi dan evaporasi, sebagai berikut :

#### 4.8.1.1 Persiapan Sampel Daun Srikaya Kering

Daun srikaya dicuci lalu dipotong-potong kecil dan dikeringkan dengan menggunakan oven selama kurang lebih 48 jam dengan suhu 50<sup>0</sup> C kemudian dihaluskan dengan menggilingnya untuk dijadikan bubuk.

#### 4.8.1.2 Pembuatan Sediaan Ekstrak Daun Srikaya

##### 4.8.1.2.1 Proses Ekstraksi

1. Sample daun srikaya yang telah dikeringkan ditimbang (100 g).
2. Sample kering tersebut dimasukan ke dalam gelas elenmeyer ukuran 1 liter
3. Kemudian direndam dengan etanol 96% hingga volumenya 900ml
4. Dikocok hingga benar - benar tercampur ( $\pm$  30 menit)
5. Didiamkan selama 24 jam sampai mengendap
6. Proses ekstraksi ini dilakukan sampai hasil ekstraksi jernih.

Kemudian hasil dari ekstraksi tersebut siap untuk dievaporasi

##### 4.8.1.2.2 Proses Evaporasi

1. Diambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif daun srikaya yang sudah terlarut, lalu dimasukan dalam labu evaporasi 1 liter
2. Labu evaporasi dipasang pada evaporator
3. *Water bath* diisi dengan air sampai penuh
4. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (diatur sampai suhu 90<sup>0</sup> C, sesuai dengan titik didih etanol), lalu disambungkan dengan aliran listrik.

5. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu
6. Ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ( $\pm 1,5$  sampai 2 jam untuk 1 labu)
7. Ekstrak kemudian ditimbang dengan neraca analitik dan akan terbentuk ekstrak daun srikaya
8. Masukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik dan masukan dalam freezer (**Lampiran 2**).

#### 4.8.2 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

Uji identifikasi pada bakteri *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut

:

##### 4.8.2.1 Prosedur Pengecatan Gram

1. Buatlah sediaan apusan bakteri pada gelas objek
2. Tuangi sediaan dengan kristal violet selama 1 menit
3. Buang sisa kristal violet dan bilas dengan air, kristal violet berfungsi sebagai bahan warna dasar
4. Tuangi sediaan dengan lugol selama 1 menit, buang sisi lugol dan bilas dengan air
5. Tuangi sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas dengan air
6. Tuangi sediaan dengan safranin selama 0,5 menit, buang sisa safranin dan bilas dengan air. Safranin berfungsi sebagai warna pembanding
7. Keringkan sediaan menggunakan kertas penghisap

Lihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1000x

### (Lampiran 3)

#### 4.8.2.2 Tes Katalase

1. Ambilah sisa pembedihan cair yang sebagian telah dipergunakan untuk tes koagulase pada tabung
2. Tetesi dengan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%
3. Positif apabila setelah ditetesi ada gelembung udara

#### 4.8.2.3 Tes Koagulase

Teknik untuk melakukan tes koagulase yaitu dengan menggunakan gelas objek :

1. Sediakan gelas objek yang steril, lalu teteskan aquades pada tengah gelas objek
2. Teteskan sediaan bakteri *Staphylococcus aureus* dan tetesi dengan plasma darah
3. Aduk secara merata dengan jarum, tunggu sekitar 5-10 detik.
4. Hasil positif apabila terdapat gumpalan pada objek gelas.

#### 4.8.3 Persiapan Suspensi Uji *Staphylococcus aureus*

Persiapan suspensi uji *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut :  
Pembuatan sediaan bakteri dilakukan dengan cara penanaman bakteri *Staphylococcus aureus* pada medium cair dan kemudian diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37<sup>0</sup> C. Setelah itu dibuat isolat bakteri *Staphylococcus aureus* yang disesuaikan dengan Standar *Mc Farland 0,5* dan dilakukan pengenceran sebanyak 2 kali sehingga tercapai konsentrasi bakteri 1x10<sup>6</sup>.

caranya : dari 10 ml bakteri dengan konsentrasi  $10^8$  CFU/ml diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan kedalam tabung yang telah diisi 9 ml *Nutrient Broth* sehingga konsentrasi bakteri  $10^7$  CFU/ml. Lalu dari larutan dengan konsentrasi bakteri  $10^7$  CFU/ml tersebut diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan kedalam tabung yang telah diisi 9 ml *Nutrient Broth* sehingga konsentrasi bakteri menjadi  $10^6$  CFU/ml.

#### 4.8.4 Uji Antimikroba Ekstrak Daun Srikaya

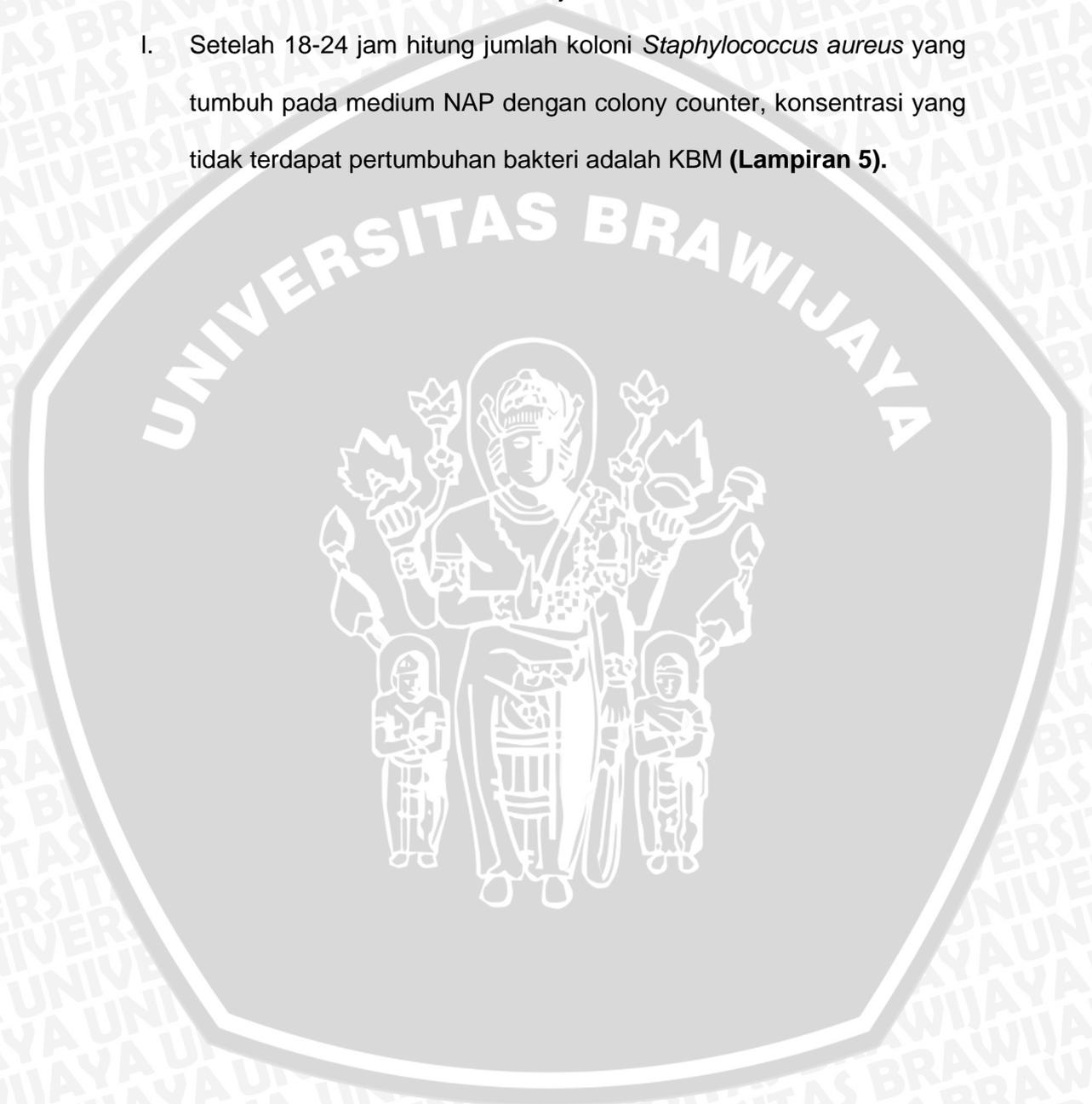
Uji antimikroba ekstrak etanol daun srikaya adalah sebagai berikut :

- a. Siapkan 7 tabung steril, beri tanda A = 20%; B = 22,5%; C = 25%; D = 27,5%; E = 30%; F = 32,5% dan KK = 0% (kontrol bakteri). Kontrol bakteri adalah biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml.
- b. Tabung reaksi KK diisi dengan 2 ml suspensi bakteri
- c. Masukkan 0,6 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda A, lalu tambahkan 0,4 ml ekstrak etanol daun srikaya dan tambahkan 1 ml biakan cair *Staphylococcus aureus* sehingga mendapatkan ekstrak dengan konsentrasi akhir 20%.
- d. Masukkan 0,55 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda B, lalu tambahkan 0,45 ml ekstrak etanol daun srikaya dan tambahkan 1 ml biakan cair *Staphylococcus aureus* sehingga mendapatkan ekstrak dengan konsentrasi akhir 22,5%.
- e. Masukkan 0,5 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda C, lalu tambahkan 0,5 ml ekstrak etanol daun srikaya dan tambahkan 1 ml biakan cair *Staphylococcus aureus* sehingga mendapatkan ekstrak dengan konsentrasi akhir 25%.

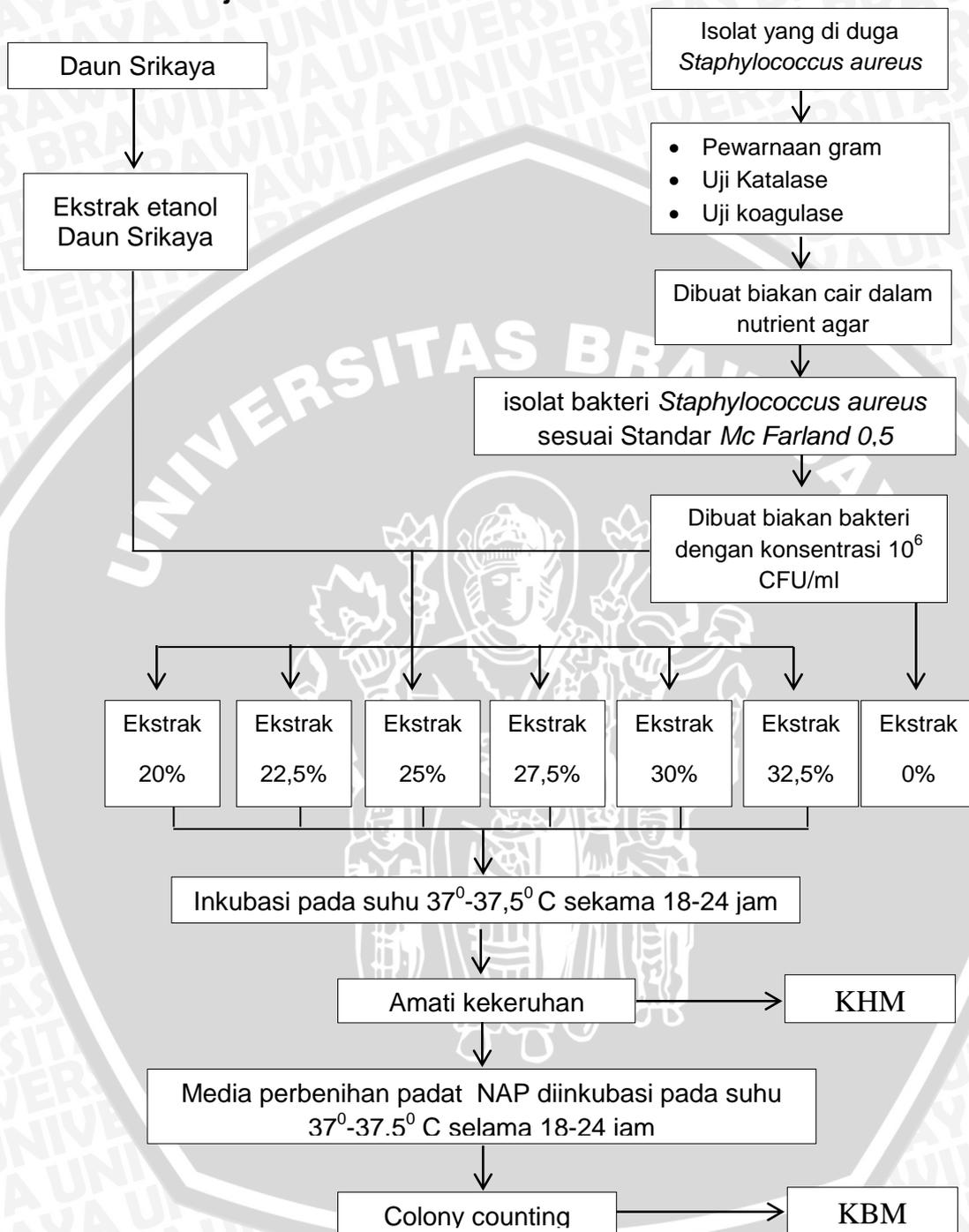
- f. Masukkan 0,45 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda D, lalu tambahkan 0,55 ml ekstrak etanol daun srikaya dan tambahkan 1 ml biakan cair *Staphylococcus aureus* sehingga mendapatkan ekstrak dengan konsentrasi akhir 27,5%.
- g. Masukkan 0,4 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda E, lalu tambahkan 0,6 ml ekstrak etanol daun srikaya dan tambahkan 1 ml biakan cair *Staphylococcus aureus* sehingga mendapatkan ekstrak dengan konsentrasi akhir 30%.
- h. Masukkan 0,35 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda F, lalu tambahkan 0,65 ml ekstrak etanol daun srikaya dan tambahkan 1 ml biakan cair *Staphylococcus aureus* sehingga mendapatkan ekstrak dengan konsentrasi akhir 32,5% (**Lampiran 4**).
- i. Semua tabung diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}$  - $37,5^{\circ}$  C selama 18-24 jam
- j. Setelah 18-24 jam atau dihari kedua semua tabung dikeluarkan dari incubator, tabung A sampai F dibandingkan kekeruhannya dengan tabung KK untuk menentukan KHM. Diperhatikan dan dicatat derajat kekeruhan pada semua tabung. Cara membaca derajat kekeruhan adalah dengan meletakkan sebuah kertas putih dibelakang tabung, dimana sebelumnya pada kertas tersebut digambar sebuah garis hitam kemudian garis hitam tersebut diperhatikan dari depan tabung. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM.
- k. Lalu untuk mengetahui KBM, dari tabung A sampai F termasuk KK diambil larutan sebanyak 1 ose atau 0,01ml kemudian dilakukan

penggoresan pada 7 NAP dengan setiap konsentrasi di ulang sebanyak 3 kali. Masing - masing NAP, kemudian diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}$  -  $37,5^{\circ}$  C selama 18-24 jam

- I. Setelah 18-24 jam hitung jumlah koloni *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada medium NAP dengan colony counter, konsentrasi yang tidak terdapat pertumbuhan bakteri adalah KBM (**Lampiran 5**).



### 4.8.5 Alur Kerja Penelitian



#### 4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh untuk uji statistik adalah data konsentrasi daun srikaya dan jumlah koloni bakteri *S. aureus*. Jika sebaran data normal dan varians sama maka dipilih uji *one way ANOVA*. Dengan menggunakan *one way ANOVA*, maka akan diketahui apakah ada perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak daun srikaya terhadap *Staphylococcus aureus*.

Setelah itu dilakukan uji statistik korelasi yang bertujuan untuk menentukan besarnya pengaruh dan arah hubungan antara konsentrasi ekstrak daun srikaya terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara in-vitro. Analisis statistic dilakukan dengan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for windows versi 16.0 dengan signifikansi 0,05 (5%).

