

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* di laboratorik *in vitro* dengan rancangan *true experiment-post test only control group design*. Uji antimikroba ini dilakukan dengan menggunakan *agar dilution test* untuk mengetahui aktivitas ekstrak tanaman parijoto (*Medinilla speciosa L*) sebagai antimikroba terhadap *Escherichia coli*. Ekstrak tanaman parijoto didapat dengan cara ekstraksi metode maserasi dengan pelarut etanol. Uji antimikroba ini dilakukan untuk menentukan kadar hambat minimum (KHM). Besarnya konsentrasi yang digunakan, ditetapkan melalui eksperimen pendahuluan.

#### 4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang pada tahun 2014.

#### 4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* dengan kepadatan  $10^6$  CFU/ml yang dikembangkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.4 Estimasi Jumlah Sampel

Untuk menghitung jumlah sampel dapat diketahui dengan rumus (Lukito, 1988)

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

keterangan : n = jumlah sampel

p = jumlah perlakuan

Pada penelitian ini, digunakan 5 macam konsentrasi (3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%) dari ekstrak tanaman parioto serta 1 kontrol kuman *Escherichia coli*, sehingga didapatkan jumlah sampel;

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

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

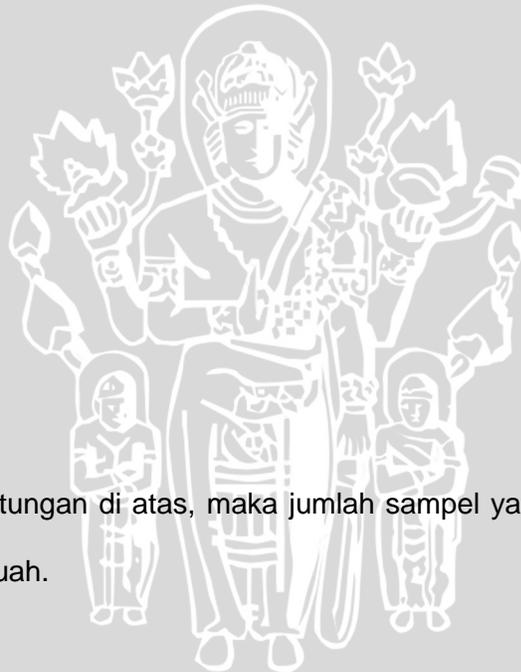
Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah sampel yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah 4 buah.

#### 4.5 Variabel Penelitian

##### 4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak tanaman parioto (*Medinilla speciosa* L) yaitu 3%, 3,5%, 4%, 4,5% dan 5%

##### 4.5.2 Variabel Tergantung



Variabel tergantung pada penelitian ini adalah tingkat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada media agar padat untuk menentukan KHM.

#### 4.6 Definisi Operasional

- Tanaman parioto yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari Materia Medica, milik Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur, yang berlokasi di Batu, Malang.
- Dalam penelitian ini yang digunakan dari tanaman parioto adalah bagian daun, batang, buah serta bunga.
- Ekstrak tanaman parioto adalah kadar atau konsentrasi ekstrak tanaman parioto yang didapatkan dengan cara ekstraksi metode maserasi dengan pelarut etanol.
- Isolat bakteri *Escherichia coli* yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang berasal dari 4 pasien yang berbeda.
- Hasil penelitian dinyatakan dalam bentuk *scoring*, yaitu +4, +3, +2, +1, 0, yang berarti:
  - +4 adalah koloni tumbuh tebal dan tidak terhitung
  - +3 adalah koloni tumbuh agak tebal dan tidak terhitung
  - +2 adalah koloni tumbuh tipis dan tidak terhitung
  - +1 adalah koloni tumbuh sangat tipis dan tidak terhitung
  - 0 berarti tidak ada pertumbuhan (Hendriksen, 2003).
- Kadar Hambat Minimal (KHM) yaitu konsentrasi terendah dari antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan metode dilusi agar

yang ditandai dengan pertumbuhan koloni kurang dari sama dengan 2 (Andrews, 2001).

#### 4.7 Instrumen Penelitian

##### 4.7.1 Alat dan Bahan untuk Kultur Bakteri

- **Alat**

1. Tabung reaksi
2. Ose
3. Lampu spiritus atau Bunsen
4. Incubator
5. Spektrofotometer

- **Bahan**

1. Bakteri *Escherichia coli*
2. Medium EMB (*Eosin Methylene Blue*)

##### 4.7.2 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram

- **Alat**

1. *Object glass* dan kaca penutup
2. Lampu spiritus atau Bunsen
3. Ose
4. Mikroskop
5. Minyak emersi
6. Korek api

- **Bahan**

1. Suspensi bakteri dari *Muller Hinton Broth*
2. Bahan pewarnaan gram : Kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin
3. Aquades steril
4. Kertas penghisap atau tissue

#### 4.7.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Tanaman Parijoto

- **Alat**

1. Evaporator
2. Labu Evaporator
3. Timbangan
4. Gelas Erlenmeyer
5. *Waterbath*

6. Blender

- **Bahan**

1. Tanaman parijoto
2. Etanol 96%
3. Aquades

#### 4.7.4 Alat dan Bahan untuk Dilusi Agar

- **Alat**

1. *Plate* kosong dan steril
2. Pipet steril ukuran 1 mL dan 10 mL
3. Incubator

- **Bahan**

1. Ekstrak tanaman parijoto



2. Suspensi bakteri
3. Media dilusi agar

#### 4.8 Rancangan Operasional Penelitian

Prosedur penelitian meliputi, pembuatan ekstrak tanaman parijoto, identifikasi ulang bakteri uji (*Escherichia coli*), persiapan suspensi bakteri uji (*Escherichia coli*) dan uji efek antimikroba ekstrak tanaman parijoto.

##### 4.8.1 Pembuatan Ekstrak Tanaman Parijoto

Pembuatan ekstrak tanaman parijoto dimulai dengan proses pengeringan, dilanjutkan dengan pembuatan proses ekstraksi dan evaporasi.

###### 1. Proses Pengeringan

- Tanaman parijoto dibersihkan dengan cara dibasuh dengan air mengalir.
- Proses selanjutnya adalah memotong atau mengiris kecil-kecil tanaman parijoto, untuk mempercepat proses pengeringan.
- Tanaman parijoto dikeringkan dengan cara di oven.

###### 2. Proses Ekstraksi

- Setelah melalui proses pengeringan, tanaman parijoto kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender hingga berbentuk bubuk.
- Timbang sebanyak 100g
- Masukkan 100g sampel kering ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter.
- Kemudian rendam dengan etanol 96% sampai volume 900 mL.
- Kocok sampai benar-benar tercampur (+30 menit).
- Didiamkan satu malam sampai mengendap.

- Proses ekstraksi ini dilakukan sampai hasil ekstraksi jernih. Kemudian hasil ekstraksi siap untuk dievaporasi.

### 3. Proses Evaporasi

- Ambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif tanaman parioto yang sudah terambil.
- Masukkan dalam labu evaporasi 1 liter.
- Pasang labu evaporasi pada evaporator.
- Isi *waterbath* dengan air sampai penuh.
- Pasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanasan *waterbath*, (atur sampai 90°C), sambungkan dengan aliran listrik.
- Biarkan larutan etanol 96% memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- Tunggu sampai aliran etanol 96% berhenti menetes pada labu penampung (+ 1,5 jam sampai 2 jam untuk 1 labu).
- Hasil yang diperoleh kira-kira 1/3 tanaman parioto kering.
- Apabila tidak sedang digunakan dalam jangka waktu yang cukup lama maka ekstrak tanaman parioto tadi dapat disimpan di dalam botol tertutup kemudian disimpan dalam *freezer*.

#### 4.8.2 Identifikasi *Escherichia coli*

Sebelum digunakan untuk penelitian, isolat *Escherichia coli* yang diperoleh diidentifikasi ulang dengan beberapa metode identifikasi antara lain: perwarnaan Gram (didapatkan bentuk *Gram* negatif), penanaman pada media Eosin Methylen Blue (EMB), dan Microbact Test 12A/E - 24E.

## 1. Pewarnaan Gram

Prosedur pewarnaan gram :

1. Bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak. Kemudian biarkan dingin.
2. Buat sediaan bakteri diatas gelas obyek dengan ketebalan yang cukup (tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis) dan dibiarkan kering diudara. Kemudian difiksasi diatas lampu bunsen.
3. Sediaan dituangi dengan Kristal Violet. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
4. Kemudian sediaan dituangi dengan Lugol. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
5. Sediaan dituangi dengan alkohol 96%. Setelah 5-10 detik, sediaan dibilas dengan air.
6. Sediaan dituangi dengan Safranin. Setelah setengah menit, sediaan dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan obyektif perbesaran 100x (Dzen dkk, 2003).

## 2. Penanaman pada Media Eosin Methylen Blue (EMB)

1. Siapkan 1 buah cawan petri berisi media EMB yang sebelumnya telah didinginkan.
2. Ambil biakan bakteri dengan ose kemudian lakukan streaking pada permukaan media EMB secara merata.

3. Tutup cawan petri, kemudia letakkan dalam inkubator dengan suhu 37<sup>o</sup> C untuk diinkubasi selama 24 jam.
4. Setelah 24 jam, lakukan pengamatan warna pada koloni bakteri yang tumbuh (Dzen dkk, 2003).

### 3. Microbact 12A/E-24E

1. Sebelum ditentukan menggunakan 12A/12E atau 24E, koloni bakteri dilakukan uji oksidase, jika hasil oksidase negative menggunakan Microbact system 12A/12E saja, sedangkan jika hasil oksidasenya positif maka menggunakan 24E.
2. Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18 – 24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 5 mL NaCl 0,9% pada tabung reaksi steril dan divortex hingga homogen.
3. Larutkan bakteri yang telah homogeny ditetaskan ke dalam sumur Microbact sebanyak 100 UI (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H<sub>2</sub>S ditambah dengan tetesan mineral oil sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu Microbact diinkubasi pada suhu 37<sup>o</sup>C selama 18 – 24 jam.
4. Microbact yang telah diinkubasi diambil, kemudian ditetaskan 2 tetes reagen Nitral A dan B pada sumur 7, pada sumur nomor 8 dengan Indol Kovact sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan TDA sebanyak satu tetes.
5. Untuk uji fermentasi karbohidrat pada microbact 12B tanpa ada penambahan reagen yaitu hasil sumuran langsung bisa dibaca hasilnya

yaitu jika fermentasi positif menunjukkan warna kuning, sedangkan hasil negative tidak ada perubahan warna tetap biru.

6. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur microbact apakah positif atau negative dengan cara membandingkan dengan table warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*.
7. Angka-angka octal didapat dan penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka octal).
8. Nama spesies bakteri dilihat dengan *software* microbact system di computer berdasarkan angka octal yang didapat.

#### 4.8.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

1. Beberapa koloni *Escherichia coli* dipindahkan ke tabung reaksi steril yang berisi *nutrient broth* dengan menggunakan ose.
2. Tabung reaksi lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10<sup>8</sup> CFU/ml (sesuai standar McFarland 0,5), lakukan perhitungan sebagai berikut:

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Keterangan:

- V1 : Volume bakteri yang akan ditambah pengencer  
N1 : Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)  
V2 : Volume suspensi bakteri uji (10 mL)  
N2 : Optical density (0,1 = setara dengan 10<sup>8</sup>/mL)

Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi  $10^8$ /ml sebanyak 10 ml.

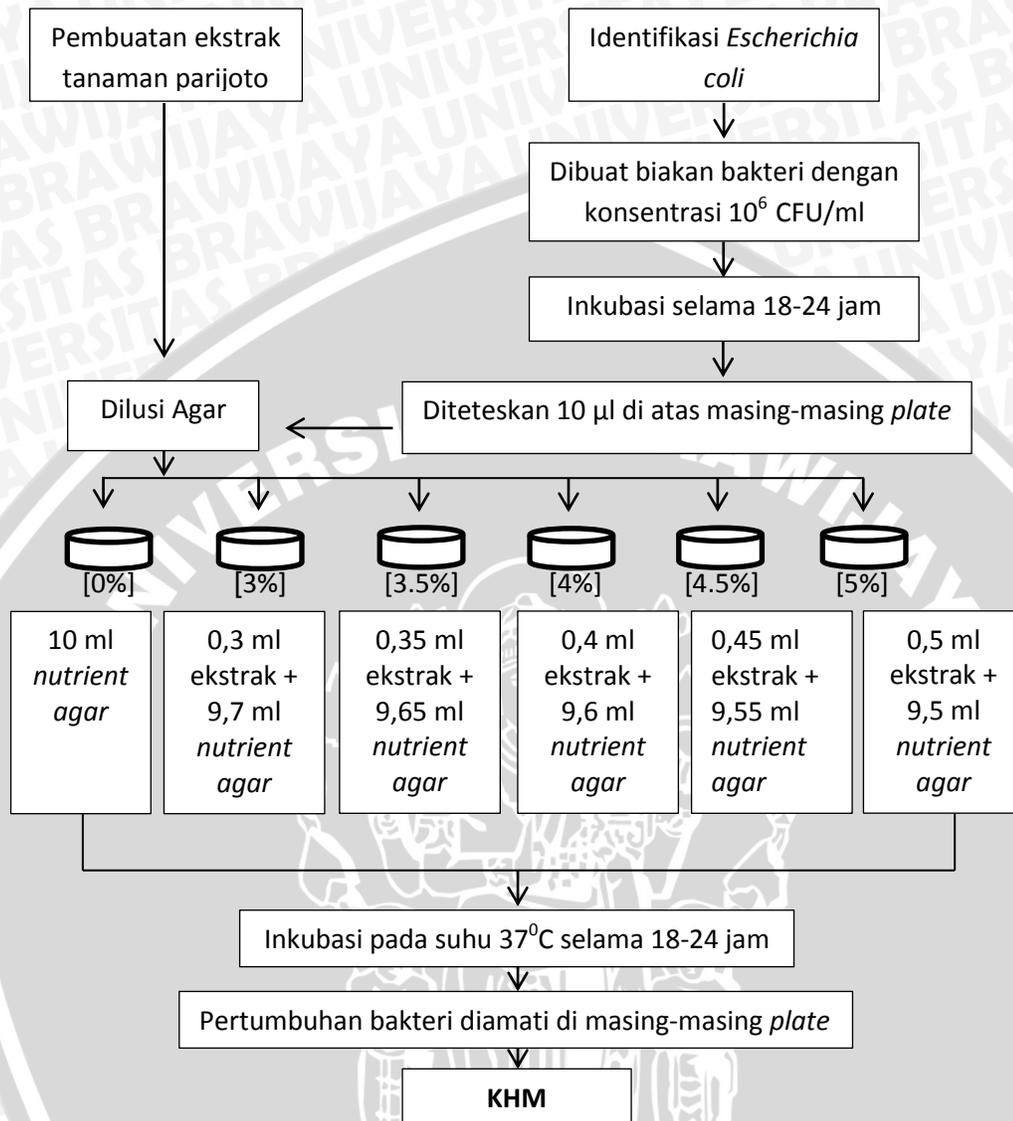
4. Lakukan pengenceran suspensi bakteri sebesar 1/100 dari konsentrasi seluma untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml, caranya: Dari 10 ml bakteri dengan konsentrasi  $10^8$  CFU/ml diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl, aduk rata sampai larutan homogen sehingga konsentrasi bakteri menjadi  $10^7$  CFU/ml. Lalu dari larutan dengan konsentrasi bakteri  $10^7$  CFU/ml tersebut diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml *nutrient broth*, aduk rata sampai larutan homogen, sehingga konsentrasi bakteri menjadi  $10^6$  CFU/ml (Dzen dkk, 2003).

#### 4.8.4 Uji Kepekaan Antimikroba Ekstrak Tanaman Parijoto

Uji Dilusi Agar :

- a. Disediakan 6 *plate* berdiameter 9 cm dan telah diberi tanda I, II, III, IV, V dan VI. *Plate* sebelumnya telah disterilisasi dengan menggunakan autoclaf (suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit), kemudian didinginkan hingga suhunya mencapai  $48-50^\circ\text{C}$ .
- b. Masing-masing *plate* diisi dengan larutan ekstrak etanol tanaman parijoto (*Medinilla speciosa L*) dengan konsentrasi 0%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% dan 5% dan dicampur dengan *nutrient agar*. Volume yang dipakai dalam setiap *plate* adalah 10 ml. Dengan perhitungannya sebagai berikut :
  - Konsentrasi 0% : tanpa ekstrak + 10 ml *nutrient agar*

- Konsentrasi 3% : 0,3 ml ekstrak etanol tanaman parijoto + 9,7 ml *nutrient agar*
  - Konsentrasi 3,5% : 0,35 ml ekstrak etanol tanaman parijoto + 9,65 ml *nutrient agar*
  - Konsentrasi 4% : 0,4 ml ekstrak etanol tanaman parijoto + 9,6 ml *nutrient agar*
  - Konsentrasi 4,5% : 0,45 ml ekstrak etanol tanaman parijoto + 9,55 ml *nutrient agar*
  - Konsentrasi 5% : 0,5 ml ekstrak etanol tanaman parijoto + 9,5 ml *nutrient agar*
- c. Bakteri uji yang dipakai adalah bakteri yang diencerkan sampai  $10^6$  CFU/ml.
- d. Keesokan harinya, setiap *plate* tersebut dibagi 4 untuk masing-masing isolat karena dalam penelitian ini menggunakan 4 isolat yang akan ditetesi bakteri uji sebanyak 10 $\mu$ l ( $10^4$  CFU/tetes). Kemudian semua *plate* diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- e. Koloni yang tumbuh pada agar *plate* diamati. *Plate* dengan konsentrasi terendah dimana tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni bakteri adalah *plate* dengan konsentrasi yang dapat disebut sebagai kadar hambat minimum (KHM) (Andrews,2001).



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

#### 4.9 Analisa Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari hasil pertumbuhan koloni *Escherichia coli* pada agar *plate* yang telah diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Analisis data yang digunakan adalah uji statistik Kruskal Wallis untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh ekstrak tanaman parijoto terhadap *Escherichia coli* sehingga dapat disimpulkan apakah ekstrak tanaman parijoto (*Medinilla speciosa L*) mempunyai efek antimikroba terhadap *Escherichia coli*. Uji Mann Whitney digunakan untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian ekstrak tanaman parijoto (*Medinilla speciosa L*) sebagai antimikroba terhadap *Escherichia coli* pada setiap konsentrasi yang diberikan. Dan uji Korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan dari pemberian ekstrak tanaman parijoto (*Medinilla speciosa L*) terhadap pertumbuhan koloni *Escherichia coli*. Dalam perhitungan hasil penelitian ini digunakan batas kepercayaan 95% untuk tingkat signifikansi ( $\alpha$ ) = 0,05.