

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Uji antimikroba ini dilakukan dengan menggunakan metode dilusi agar untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun kembang merak (*Caesalpinia pulcherrima*) sebagai antimikroba terhadap *Salmonella* Typhi. Uji antimikroba ini dilakukan untuk mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol daun kembang merak terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella* Typhi.

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan yakni tidak diberikan pemberian ekstrak konsentrasi 0% (Kontrol Positif). Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%. Besarnya konsentrasi yang digunakan, ditetapkan melalui penelitian pendahuluan.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang yang dilakukan selama bulan September sampai bulan Oktober pada tahun 2014.

4.3 Sampel dan Estimasi Jumlah Pengulangan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kembang merak dan menggunakan bakteri uji *Salmonella* Typhi yang

dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Isolat bakteri *Salmonella* Typhi yang digunakan berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Daun kembang merak yang digunakan adalah daun kembang merak yang diekstraksi di Polinema Malang.

Pada penelitian ini, digunakan 5 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda serta 1 kontrol positif, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus Estimasi Besar Sampel sebagai berikut:

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5 \approx 4 \text{ (Solimun, 2001).}$$

Keterangan : n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (jumlah banyaknya konsentrasi)

Jadi, pada masing - masing perlakuan dalam penelitian ini akan dilakukan 4 kali pengulangan.

4.4 Variable Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah ekstrak daun kembang merak (*Caesalpinia pulcherrima*) dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, dan 12,5%. Konsentrasi

tersebut ditentukan sebagai konsentrasi pada penelitian pendahuluan. Pada konsentrasi 2,5% tidak ditemukan pertumbuhan koloni. Sehingga dilakukan penelitian definitif dengan menggunakan konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, dan 2,5%.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah tingkat pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* yang tumbuh pada medium NAP untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM).

4.5 Definisi Operasional

4.5.1. Daun kembang merak (*Caesalpinia pulcherrima*) yang digunakan dalam penelitian ini dipilih daun yang muda, segar dan berwarna hijau dan berasal dari satu pohon kemudian bahan diidentifikasi di Balai Materia Medika. Setelah itu, bahan diproses hingga menjadi simplisia.

4.5.2. Daun kembang merak diekstraksi dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi. Ekstrak yang dihasilkan dianggap memiliki kandungan bahan aktif sebesar 100%

4.5.3. Isolat bakteri *Salmonella Typhi* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5.4. Kadar Hambat Minimum (KHM) dapat ditentukan yaitu pada konsentrasi terendah dari antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan metode dilusi agar yang ditandai

dengan tidak didapatkan pertumbuhan koloni pada medium agar (NCCLS, 2003).

4.5.5. Hasil penelitian dinyatakan dalam bentuk scoring yaitu +4, +3, +2, +1, 0, yang berarti:

+4 adalah koloni tumbuh sangat tebal dan tidak terhitung

+3 adalah koloni tumbuh tebal dan tidak terhitung

+2 adalah koloni tumbuh tipis dan tidak terhitung

+1 adalah koloni tumbuh sangat tipis dan tidak terhitung

0 adalah tidak ada pertumbuhan koloni

4.6 Rancangan Operasional Penelitian

4.6.1 Prosedur Penelitian Pada Ekstrak Daun Kembang Merak

4.6.1.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Kembang Merak

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun kembang merak antara lain: blender, timbangan analitik, serbuk daun kembang merak, aquades, baker glass, kertas saring whatman no.40 untuk penyaringan daun kembang merak yang direndam dengan etanol 96%, gelas erlenmeyer, dan vacuum oven.

4.6.1.2 Ekstraksi dan Evaporasi

A. Pengolahan Daun Kembang Merak (*Caesalpinia pulcherrima*)

- 1) Daun kembang merak dicuci dari kotoran, tiriskan, lalu keringkan dari air, selanjutnya ditimbang.
- 2) Daun dikeringkan dengan sinar matahari (dianginkan).

- 3) Daun kembang merak kering diblender halus menjadi bubuk lalu ditimbang dalam neraca analitik seberat 100 gram.

B. Prosedur Ekstraksi

Proses ekstraksi daun kembang merak dilakukan dengan metode Maserasi dengan pelarut etanol 96% sesuai dengan prosedur standar Laboratorium Tehnik Kimia Polinema Malang (Handa, 2005).

- 1) Daun kembang merak ditimbang seberat 100 gram. Kemudian serbuk daun kembang merak direndam dengan pelarut etanol 96% dalam wadah beker glass dengan perbandingan 1 : 3 (1 kg bahan → 3 liter pelarut etanol 96%).
- 2) Merendam bahan dan mendinginkan pada suhu kamar selama minimal 2x24 jam dengan sesekali diaduk. Setelah 2x24 jam, rendaman dalam baker glass tersebut disaring.
- 3) Menyaring bahan rendaman dengan menggunakan kertas saring whatman no.40, hasil penyaringannya diwadahi dengan erlenmeyer glass.
- 4) Pelarut yang diperoleh (yang mengandung bahan aktif) di evaporasi untuk menghilangkan sisa pelarut etanol 96% dengan menggunakan vacuum oven.
- 5) Mengoven kembali sisa pelarut yang tersisa dengan vacuum oven dengan suhu 40-50°C sehingga benar-benar tidak mengandung pelarut etanol.

4.6.2 Identifikasi bakteri *Salmonella Typhi*

4.6.2.1 Pewarnaan Gram

A. Alat dan Bahan Untuk Pewarnaan Gram Bakteri

Isolat bakteri *Salmonella Typhi*, kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin, gelas objek, kertas penghisap, mikroskop binokuler, ose, minyak emersi dan air (Dzen *et al.*, 2003).

B. 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, selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan obyektif perbesaran 100x. Hasil yang tampak bakteri *Salmonella Typhi* berbentuk batang berwarna merah (Dzen *et al.*, 2003).

4.6.2.2 Penanaman pada media BSA (*Bismuth Sulfite Agar*)

Penanaman bakteri pada *Bismuth Sulfite Agar* (BSA) merupakan media selektif terhadap pertumbuhan *Salmonella Typhi*. Penanaman bakteri pada media tersebut didapatkan gambaran *Black Jet Colony* (terbentuknya koloni hitam) yang merupakan gambaran khas dari *Salmonella Typhi* (Vaishnavi, 2013).

Prosedur identifikasi bakteri pada medium BSA:

1. Dilakukan inokulasi bakteri *Salmonella Typhi* dengan metode *streaking* pada medium *Bismuth Sulfite Agar* (BSA).
2. Sediaan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya.
3. Koloni bakteri *Salmonella Typhi* pada medium BSA menghasilkan gambaran *Black Jet Colony* (koloni berwarna hitam).

4.6.2.3 Penanaman pada media MacConkey

Pada hari pertama, biakan bakteri *Salmonella Typhi* di *nutrient broth* diambil satu ose, kemudian dilakukan tes oksidase. Pada penelitian ini dilakukan tes oksidase metode kertas filter.

1. Kertas filter dibasahi dengan larutan reagen *tetramethyl p-phenylene-diamine dihydrochloride* 1%.
2. Koloni bakteri yang diperiksa digoreskan dengan ose platina pada kertas filter tersebut.
3. Tes oksidase dinyatakan positif apabila warna goresan tersebut menjadi ungu tua dalam waktu 10 detik.

Pada *Salmonella Typhi*, hasilnya negatif. Setelah dilakukan tes oksidase, bakteri ditanam pada medium MacConkey untuk mendapatkan

koloni terpisah, kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C. *Salmonella* Typhi tidak memfermentasikan laktosa sehingga koloninya berwarna pucat pada medium MacConkey (WHO, 2003).

4.6.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

4.6.3.1 Beberapa koloni *Salmonella* Typhi dipindahkan ke tabung reaksi steril yang berisi *nutrient broth* dengan menggunakan ose.

4.6.3.2 Tabung reaksi lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

4.6.3.3 Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml yang setara dengan OD (*Optical Density*) = 0,1 (Murray *et al.*, 1999) dengan 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 10^8 /mL)

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

4.6.3.4 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 *et al.*, 2003).

4.6.4 Uji Kepekaan Antimikroba Ekstrak Daun Kembang Merak

Uji kepekaan bakteri pada penelitian ini menggunakan metode dilusi agar. Prosedur dari metode dilusi agar adalah sebagai berikut (CLSI, 2003):

4.6.4.1 Disediakan 6 *plate* berdiameter 9 cm dan telah diberi tanda I, II, III, IV, V dan VI. *Plate* sebelumnya telah disterilisasi dengan menggunakan otoklaf (suhu 121°C selama 15 menit), kemudian didinginkan hingga suhunya mencapai $48\text{-}50^{\circ}\text{C}$.

4.6.4.2 Masing-masing *plate* diisi dengan larutan ekstrak etanol daun kembang merak (*Caesalpinia pulcherrima*) dengan konsentrasi 0%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% dan dicampur dengan *nutrient agar*. Volume yang dipakai dalam setiap *plate* adalah 10 ml. Dengan perhitungannya sebagai berikut:

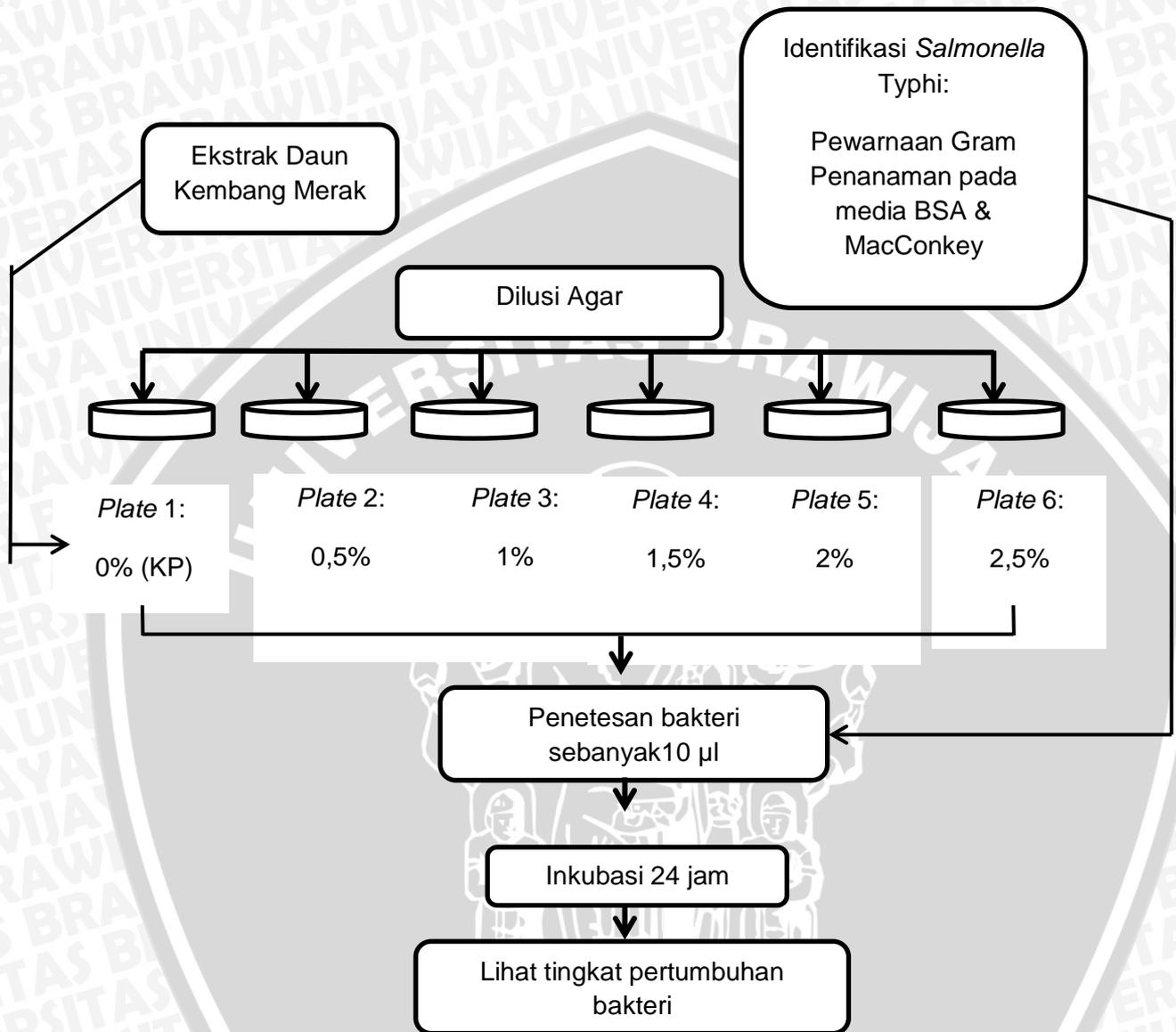
- Konsentrasi 0% : tanpa ekstrak + 10 ml *nutrient agar*
- Konsentrasi 0,5% : 0,05 ml ekstrak etanol daun kembang merak + 9,95 ml *nutrient agar*
- Konsentrasi 1% : 0,1 ml ekstrak etanol daun kembang merak + 9,9 ml *nutrient agar*

- Konsentrasi 1,5% : 0,15 ml ekstrak etanol daun kembang merak + 9,85 ml *nutrient agar*
- Konsentrasi 2% : 0,2 ml ekstrak etanol daun kembang merak + 9,8 ml *nutrient agar*
- Konsentrasi 2,5% : 0,25 ml ekstrak etanol daun kembang merak + 9,75 ml *nutrient agar*

4.6.4.3 Keesokan harinya, setiap *plate* tersebut dibagi 4 untuk masing-masing perlakuan karena dalam penelitian ini menggunakan 4 pengulangan yang masing-masing akan ditetesi bakteri uji sebanyak 1 tetes mikro pipet yang setara dengan 10 μ l mengandung 10⁴CFU/ml. Bakteri uji yang dipakai adalah bakteri yang diencerkan sampai 10⁶CFU/ml.

4.6.4.4 Kemudian semua *plate* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

4.6.4.5 Koloni yang tumbuh pada agar *plate* diamati. KHM ditentukan pada *Plate* dengan konsentrasi terendah yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni bakteri.



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian Ekstrak Etanol Daun Kembang Merak terhadap *Salmonella Typhi*

4.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data kualitatif dari hasil pertumbuhan koloni *Salmonella Typhi* pada agar plate yang diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam berupa data konsentrasi ekstrak daun kembang merak dan pertumbuhan koloni bakteri. Analisis yang digunakan adalah uji

statistik Kruskal-Wallis untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak daun kembang merak terhadap *Salmonella* Typhi sehingga dapat disimpulkan jika ekstrak daun kembang merak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan koloni *Salmonella* Typhi, uji Mann-Whitney yang digunakan untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian ekstrak daun kembang merak sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella* Typhi pada setiap konsentrasi yang diberikan, dan uji korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian ekstrak daun kembang merak dengan pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella* Typhi. Dalam penelitian ini, besar kepercayaan yang dipakai adalah 0,95 untuk tingkat signifikansi (α)= 0,05.

