

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain penelitian eksperimental laboratoris secara *in vitro*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak daun Akar Kucing (*Acalyphus indica* Linn) terhadap bakteri *E.coli*. Uji kepekaan antimikroba dengan menggunakan dilusi tabung (*tube dilution test*). Metode dilusi cair yaitu dengan menggunakan tabung reaksi yang diisi ekstrak daun Akar Kucing. *Tube dilution test* meliputi dua tahap. Tahap pertama yaitu tahap pengujian bahan pada media yang ditujukan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal), dan tahap *streaking* pada media NAP yang ditujukan untuk menentukan KBM (Kadar Bunuh Minimal) dari ekstrak daun Akar Kucing terhadap bakteri *E.coli*.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

4.2.1 Waktu

Penelitian ini dilaksanakan antara bulan Agustus - Desember 2014.

4.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3 Sampel dan Besar Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *E.coli* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pada penelitian ini digunakan 6 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda dan 1 kontrol negatif, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus Federer, estimasi pengulangan yaitu :

$$t(n-1) \geq 15 \text{ (Ariyani dkk, 2007)}$$

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

Keterangan :

n = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka banyaknya pengulangan jumlah dari sampel bakteri *E.coli* yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4.



4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah pertumbuhan *E.coli*.

4.4.2 Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun Akar Kucing (*Acalyphus indica Linn*) dengan konsentrasi yang berbeda- beda.

4.5 Definisi Operasional

1. Daun Akar Kucing yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Akar Kucing yang sudah tua, dan didapat di Materia Medica Batu.
2. Ekstrak daun Akar Kucing adalah daun Akar Kucing dalam bentuk serbuk kemudian dijadikan ekstrak cair dengan menggunakan bahan pengestrak etanol 96%.
3. *E.coli* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari bakteri *E.coli* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi antimikroba terendah yang mampu menghambat pertumbuhan kuman.
5. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi antimikroba terendah yang mampu membunuh kuman.

6. *Original inoculum* adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL yang diinokulasi sebagai konsentrasi awal bakteri yang akan dipergunakan untuk mencari kategori KBM.
7. Kontrol negatif adalah ekstrak daun Akar Kucing murni yang tidak dicampur dengan bakteri *E.coli* yang digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril di mana nilai kontrol negatif adalah 0 (tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri jenis apa pun).
8. Kontrol positif adalah biakan *E.coli* murni yang tidak dicampur dengan ekstrak daun Akar Kucing yang dapat digunakan sebagai standar jumlah pertumbuhan bakteri tanpa ekstrak daun Akar Kucing.
9. Kadar konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0%, 5% $\frac{v}{v}$, 6% $\frac{v}{v}$, 7% $\frac{v}{v}$, 8% $\frac{v}{v}$, dan 9% $\frac{v}{v}$.
10. Tingkat kekeruhan pada masing- masing tabung akan dievaluasi menggunakan kertas putih bergaris- garis hitam yang diposisikan tepat dibelakang tabung.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri yang akan digunakan, dilakukan dua proses, yaitu proses pewarnaan Gram dan proses penanaman pada medium EMB (*Eosin Methylen Blue*). Alat yang diperlukan untuk proses pewarnaan Gram antara lain mikroskop, kertas penghisap, lampu spiritus, gelas objek, dan gelas penutup. Sedangkan bahan

yang diperlukan adalah isolat *E.coli*, pewarna Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin) dan minyak emersi.

Alat yang digunakan untuk proses penanaman pada medium EMB adalah ose lurus. Sedangkan bahan yang digunakan dalam proses ini adalah *Nutrient Broth* dan medium EMB.

4.6.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Akar Kucing

Proses dalam pembuatan ekstrak daun Akar Kucing yaitu pengeringan, ekstraksi, dan evaporasi. Sebelum dilakukan pengeringan, daun dicuci bersih dengan air kemudian ditiriskan dan dipotong lebih kecil. Proses pengeringan menggunakan oven dan alat pengering untuk mengeringkan bahan penelitian setelah dicuci.

Alat yang digunakan untuk ekstraksi adalah blender untuk menghaluskan daun Akar Kucing, kertas saring untuk membungkus serbuk daun Akar Kucing, gelas ekstraksi dan neraca analitik.

Alat yang digunakan dalam proses evaporasi 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 etanol, batu didih dan cawan penguap.

Sedangkan bahan yang digunakan pada proses pengeringan, ekstraksi, dan evaporasi di atas adalah daun Akar Kucing, etanol 96% dan aquades.

4.6.3 Alat dan Bahan Uji Kepekaan Ekstrak Daun Akar Kucing

Alat- alat yang digunakan antara lain : tabung reaksi, steril ose, mikropipet 1 ml, inkubator, lampu spiritus, label, dan vortex. Sedangkan bahan yang digunakan dalam prosedur kali ini antara lain : bembenihan cair bakteri *E.coli*, ekstrak daun Akar Kucing, *Nutrient Broth*, medium NAP, dan aquades.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini berupa ekstrak daun Akar Kucing yang dibuat dengan cara berikut :

a. Proses Ekstraksi

1. Menimbang sebanyak 100 gram (serbuk daun Akar Kucing).
2. Masukkan 100 gram daun Akar Kucing kering ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter.
3. Kemudian merendam dengan etanol sampai volume 900 ml.
4. Mengocok daun Akar Kucing dan etanol sampai benar- benar tercampur (\pm 30 menit).
5. Mendinginkan hasil kocokan semalam sampai mengendap.

b. Proses Evaporasi

1. Mengambil lapisan atas dari campuran etanol dengan zat aktif daun Akar Kucing yang sudah terpisah saat ekstraksi.
2. Memasukkan dalam labu evaporasi pada evaporator.

3. Mengisi *water bath* dengan air sampai penuh.
4. Memasang sampai rangkaian alat termasuk pendingin spiral, pemanas *water bath* (atur sampai suhu 90⁰ C), kemudian menyambungkan dengan aliran listrik.
5. Membiarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
6. Menunggu sampai larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
7. Memasukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik.
8. Menyimpan dalam lemari pendingin (*freezer*).

4.7.2 Preparasi Bakteri

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan Gram :

1. Membersihkan gelas obyek dan sterilkan dengan memanaskan di atas nyala api spiritus.
2. Membuat sediaan apusan kuman pada gelas obyek, keringkan kemudian rekatkan di atas api Bunsen.
3. Meneteskan kristal violet hingga menutupi permukaan bakteri, dan mendinginkan selama 1 menit.
4. Membilas pewarna kristal violet dengan air. Dan bersihkan sisa air dengan tissue kering.

5. Menuangi sediaan dengan Lugol selama 1 menit, kemudian membuang sisa Lugol dan membilas dengan air.
6. Menuangi sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur, kemudian membuang sisa Alkohol dan membilas dengan air.
7. Menuangi sediaan dengan Safranin selama 30 detik, kemudian membuang sisa Safranin dan membilas dengan air.
8. Mengeringkan sediaan dengan menggunakan kertas pengisap. Dan selanjutnya dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 100x dengan bantuan minyak emersi.

4.7.2.2 Penanaman Bakteri pada Medium EMB

1. Menyiapkan medium EMB sehari sebelum digunakan dan menyimpannya di tempat yang gelap pada suhu ruangan.
2. Mengambil bakteri dari pembenihan cair sebanyak 1 ose.
3. Menggoreskan bakteri tersebut pada medium EMB.
4. Menginkubasi biakan bakteri dalam medium EMB tersebut selama 18-24 jam dengan suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
5. Mengamati pertumbuhan bakteri yang menunjukkan koloni khas berwarna hijau metalik.

4.7.2.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

1. Dilakukan pemeriksaan spektrofotometri pada hasil kultur medium cair MH Broth, dengan panjang gelombang 540 nm untuk mengetahui nilai absorbansi dari suspensi.
2. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar $10^8/\text{ml}$ yang setara dengan OD (Optical Density) = 0,1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut :

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

Keterangan :

N1 = nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V1 = volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N2 = OD (0,1 = setara dengan $10^8/\text{ml}$)

V2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

3. Dari perhitungan tersebut diperoleh volume (dalam ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi $10^8/\text{ml}$ sebanyak 10 ml. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi $10^8/\text{ml}$ sebanyak 10 ml, selanjutnya dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan MH Broth sehingga diperoleh suspensi bakteri sebanyak 10 ml dengan konsentrasi bakteri $10^6/\text{ml}$. Kini suspensi bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

4.7.3 Pengujian Efek Antimikroba

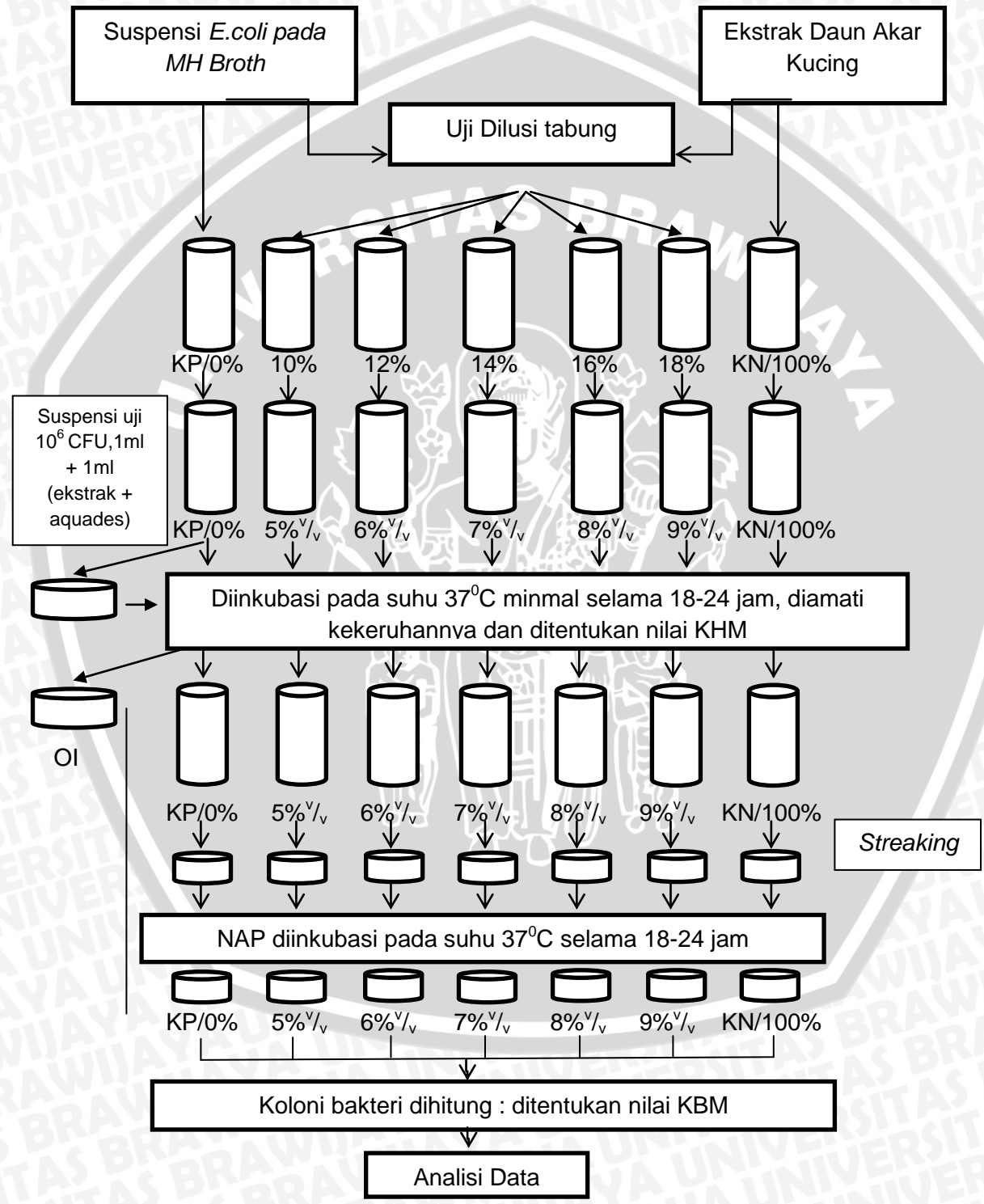
1. Menyiapkan tabung kosong dan steril berjumlah 7 buah, 5 tabung sebagai uji antibakteri dan 1 tabung sebagai kontrol kuman/ kontrol positif (KP), dan 1 tabung sebagai kontrol bahan/ kontrol negatif (KN)
2. Menyiapkan pula aquades dan larutan bakteri uji.
3. Memasukkan 0,9 mL aquades steril ke dalam tabung bertanda 10%, lalu tambahkan 0,1 mL ekstrak daun Akar Kucing.
4. Memasukkan 0,88 mL aquades steril ke dalam tabung bertanda 12%, lalu tambahkan 0,12 mL ekstrak daun Akar Kucing.
5. Memasukkan 0,86 mL aquades steril ke dalam tabung bertanda 14%, lalu tambahkan 0,14 mL ekstrak daun Akar Kucing.
6. Memasukkan 0,84 mL aquades steril ke dalam tabung bertanda 16%, lalu tambahkan 0,16 mL ekstrak daun Akar Kucing.
7. Memasukkan 0,82 mL aquades steril ke dalam tabung bertanda 18%, lalu tambahkan 0,18 mL ekstrak daun Akar Kucing.
8. Masukkan 1 mL ekstrak daun Akar Kucing ke dalam tabung KN dan masukkan 1 mL suspensi bakteri saja ke dalam tabung KP.
9. Tambahkan 1 mL suspensi *E.coli* dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/mL ke dalam tabung 1-5.
10. Ambil bakteri dari tabung bertanda KP sebanyak 1 ose kemudian digoreskan ke NAP sebagai *original inoculum*.
11. Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18- 24 jam.

12. Memperhatikan dan mencatat pada tabung nomor berapa tampak mulai terjadi kekeruhan. Cara membaca derajat kekeruhan adalah dengan meletakkan sebuah kertas putih bergaris hitam dan meletakkannya di belakang tabung, kemudian garis hitam tersebut diperhatikan dari depan tabung. Kadar terendah pada tabung yang menunjukkan tidak ada kekeruhan merupakan KHM.
13. Untuk memperoleh data KBM, dilakukan penanaman isi tabung yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan (kekeruhan) sebanyak 0,1 ml (satu mata ose) pada medium NAP. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18- 24 jam kemudian dilihat ada tidaknya pertumbuhan koloni kuman.
14. Prosedur penelitian dilakukan dengan sterilisasi alat menggunakan *autoclave*.

Tabel 4.1 Persiapan Ekstrak daun Akar Kucing

Tabung	Konsentrasi (% v/v)	Ekstrak (mL)	Aquades (mL)	Total (mL)
1	0 (KP)	0	1	1
2	5	0,1	0,9	1
3	6	0,12	0,88	1
4	7	0,14	0,86	1
5	8	0,16	0,84	1
6	9	0,18	0,82	1
KN	Kontrol negatif (100%)	1	0	1

4.8 Kerangka Operasional Penelitian



Keterangan :

KP : Kontrol Positif KN : Kontrol Negatif

OI : *Original Inoculum* NAP : *Natrium Agar Plate*

Gambar 4.1 Bagan Alur Uji Antimikroba Ekstrak Daun Akar Kucing terhadap *E.coli*

4.9 Analisis Data

Analisi data menggunakan uji statistik *One Way Anova*, pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha < 0,05$). Uji Anova satu arah ini digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian berbagai macam konsentrasi ekstrak daun Akar Kucing terhadap jumlah koloni bakteri *E.coli*. Sedangkan untuk mengetahui hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak dengan penurunan jumlah koloni bakteri digunakan Uji Korelasi dan Regresi dengan taraf kepercayaan 95%.