

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik. Penelitian ini dilakukan untuk menguji efek antimikroba dari ekstrak etanol daun dewa (*Gynura segetum*) terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro* yang terdiri dari dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan untuk menentukan KHM dan tahap streaking pada media NAP (*Nutrient Agar Plate*) untuk menentukan KBM.

4.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juli sampai Agustus tahun 2014

4.3. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu isolat bakteri *Shigella dysenteriae* yang dimiliki oleh laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, berasal dari isolat standart.

4.4. Estimasi Jumlah Pengulangan

Pada penelitian ini, digunakan 6 macam dosis konsentrasi ekstrak daun dewa (yang ditentukan melalui penelitian pendahuluan) berbeda serta 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan

Dalam penelitian ini, estimasi pengulangan sebagai berikut :

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6 \geq 21$$

$$n \geq 21/6$$

$$n \geq 3,5 \approx 4 \text{ (Ariyani et al., 2007)}$$

Keterangan : n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan

Jadi, pada masing-masing perlakuan dalam penelitian ini akan dilakukan 4 kali pengulangan dengan menggunakan 1 isolat *Shigella dysenteriae*. Jumlah setiap sampel adalah 10^6 CFU/ml bakteri *Shigella dysenteriae*.

4.5. Variabel Penelitian

4.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah berbagai konsentrasi ekstrak daun dewa : 20% v/v, 22% v/v, 24% v/v, 26% v/v, 28% v/v, 30% v/v, KK (kontrol Kuman), dan KB (Kontrol Bakteri). Penentuan konsentrasi tersebut diperoleh melalui penelitian pendahuluan.

4.5.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah tingkat kekeruhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada medium *broth* (untuk menentukan KHM) dan jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada medium NAP dengan metode penggoresan (untuk menentukan KBM).

4.6. Definisi Operasional.

- 1) Daun dewa (*Gynura segetum*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Balai Materia Medika Kota Batu, Malang, Jawa Timur dalam bentuk serbuk.
- 2) Ekstrak daun Dewa adalah ekstrak cair dari daun Dewa yang diekstrak menggunakan pelarut etanol 96% melalui proses maserasi dan evaporasi untuk menghilangkan pelarut etanol
- 3) Isolat bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan isolat dengan nomor 2312 – F yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat-alat untuk Pembuatan Ekstrak Daun Dewa

Alat-alat yang sering digunakan, diantaranya penggiling untuk menghaluskan daun dewa, saringan serbuk, timbangan untuk mengukur berat serbuk daun dewa, baker glass, kertas saring whatman untuk penyaringan daun dewa yang direndam dengan etanol 96%, vacuum oven untuk evaporasi dan gelas elenmenyer.

4.7.2 Bahan-bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun Dewa

Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun dewa antara lain daun dewa, etanol 96%, dan aquades.

4.7.3 Identifikasi Bakteri

4.7.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam identifikasi dan tes kepekaan ekstrak terhadap bakteri antara lain: cawan petri, ose, tabung reaksi, labu Erlenmeyer, Thermometer, incubator, gelas obyek, Bunsen, korek api, spidol permanen, pipet steril 10 ml, mikroskop, penggaris, dan *colony counter*.

4.7.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam identifikasi dan tes kepekaan ekstrak bakteri antara lain: ekstrak daun dewa, isolat *Shigella dysenteriae*, nutrient broth, medium NAP, aquades.

4.7.4 Uji Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Dewa

4.7.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam uji kepekaan ekstrak etanol daun dewa antara lain: tabung reaksi, ose, mikropipet 1ml, incubator, lampu spiritus, dan vortex.

4.7.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam uji kepekaan daun dewa antara lain : ekstrak daun dewa, perbenihan cairan bakteri *Shigella dysenteriae*, Nutrient Broth (NB), Nutrient Agar Plate (NAP) dan aquades.

4.8 Prosedur Kerja Penelitian

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Dewa

Didalam penelitian ini dipergunakan bahan uji berupa ekstrak etanol daun dewa yang dibuat dengan cara berikut:

4.8.1.1 Proses Pengeringan

- 1) Mencuci bersih daun dewa yang akan dikeringkan
- 2) Dikeringkan dibawah cahaya matahari

4.8.1.2 Proses Ekstraksi

- 1) Setelah kering, haluskan dengan blender sampai halus
- 2) Menimbang sebanyak 350 gram daun dewa
- 3) Kemudian rendam dengan etanol sampai volume 3750 ml
- 4) Mengocok sampai benar-benar tercampur (30 menit)
- 5) Mendinginkan semalam sampai mengendap

4.8.1.3 Proses Evaporasi

- 1) Mengambil lapisan atas campuran etanol
- 2) Memasukkan labu evaporasi pada evaporator
- 3) Mengisi waterbath dengan air sampai penuh
- 4) Memasang semua rangkaian alat termasuk pendingin spiral, pemanas waterbath (atur sampai suhu 90°C), sambungkan dengan arus 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) Menyimpan dalam freezer

4.8.2 Identifikasi Bakteri *Shigella dysenteriae*

Dilakukan pemurnian bakteri terlebih dahulu dengan menanam bakteri yang diduga *Shigella dysenteriae* pada NAP, diinkubasikan dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Dilakukan uji ulang, masing-masing dilakukan dengan pewarnaan gram, perbenihan pada agar *MacConkey*, perbenihan pada agar TSI (*Triple Sugar Iron*).

Masing-masing uji ulang adalah sebagai berikut: (WHO, 2007)

4.8.2.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan Gram:

- 1) Satu ose bakteri dari biakan cair diletakkan pada *object glass* ditunggu hingga kering
- 2) Difiksasi dengan memberikan pemanasan secukupnya
- 3) Diberi larutan kristal violet, diamkan 1 menit
- 4) Dibilas dengan air yang mengalir
- 5) Diberi larutan lugol diamkan 1 menit

- 6) Dibilas dengan air yang mengalir
- 7) Diberi larutan alkohol 96 % selama 5-10 detik
- 8) Dibilas dengan air yang mengalir
- 9) Diberi larutan safranin, diamkan 30 detik
- 10) Dibilas dengan air yang mengalir
- 11) Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif 100x
- 12) Dicari adanya sel bakteri bersifat Gram negatif, berbentuk batang ramping

4.8.2.2 Perbenihan Pada Agar *MacConkey*

- 1) Dilakukan inokulasi bakteri *Shigella dysenteriae* dengan metode spreading pada medium Mac Conkey agar.
- 2) Inkubasikan pada incubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya.
- 3) Bila warna media berubah menjadi merah artinya bakteri uji memfermentasi laktosa (Dzen dkk, 2007).

4.8.2.3 Tes Biokimia (IMViC MU)

Satu koloni terpisah diambil dari biakan McConkey dengan ose lurus, kemudian ditanam pada agar TSI dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pada hari berikutnya, hasil biakan dari agar TSI dilihat. Untuk *S. dysenteriae*, hasil reaksinya pada TSI agar adalah As/As; G (+); H₂S (+) atau Alk/As; G (+); H₂S (+). Selanjutnya dilakukan tes IMViC (indole, methyl-red, Voges-Proskauer, Citrate), tes urease, dan tes motilitas. Prosedurnya adalah sebagai berikut:

1. Tes Indol

- Medium *Tryptophan broth* (Indol media) diinokulasi dengan kuman yang diperiksa.

- Inkubasi selama 1-2 x 24 jam pada suhu 37°C.
- Teteskan reagens Kovacs atau Erlich's.
- Hasilnya adalah positif, yaitu jika terjadi cincin merah pada permukaan broth.

2. Tes *Methyl-red*

- Medium MR-VP diinokulasi dengan kuman yang diperiksa.
- Inkubasi selama 1-2 x 24 jam pada suhu 37°C.
- Tetesi dengan 5 tetes indikator methyl red.
- Hasilnya adalah positif, yaitu jika warna medium menjadi merah.

3. Tes Voges-Proskauer

- Medium MR-VP diinokulasi dengan kuman yang diperiksa.
- Inkubasi selama 1-2 x 24 jam pada suhu 37°C.
- Tambahkan alpha-naphtol dalam alkohol absolut (15 tetes) + KOH 40 % (10 tetes).
- Hasilnya adalah positif, yaitu jika terjadi warna merah kecoklatan (terbentuk acetylmethylcarbinol) dalam waktu 15 – 30 menit (Dzen dkk, 2007).

4.8.3 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri Kepadatan 10^6 bakteri/ml

- 1) Mengambil koloni *Shigella dysenteriae* dengan karakteristik sama dari media *Nutrient Agar Plate* dengan menggunakan ose.
- 2) Memasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient broth*, kemudian lakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625nm, untuk mengetahui *optical density (OD)* dari suspensi tersebut.
- 3) Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 /mL yang setara dengan OD (*Optical Density*) = 0,1 (Murray *et al.*, 1999), melakukan penghitungan sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan :

N_1 = Hasil Spektrofotometri

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengencer

N_2 = OD (0,1 setara dengan 10^8)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 mL)

- 4) Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 /mL sebanyak 10 mL.
- 5) Melakukan pengenceran dari konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml dengan menambahkan 1ml perbenihan cair (10^8 CFU/ml) ke dalam 9ml NaCl untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10^7 CFU/ml.
- 6) Kemudian melakukan pengenceran lagi dengan mengambil 1ml perbenihan cair (10^7 CFU/ml) untuk ditambahkan pada 9ml MH *broth* sehingga akhirnya didapatkan konsentrasi bakteri yang diinginkan yaitu sebesar 10^6 CFU/ml. Selanjutnya bakteri telah siap untuk digunakan dalam penelitian

4.8.4 Pengujian Bahan

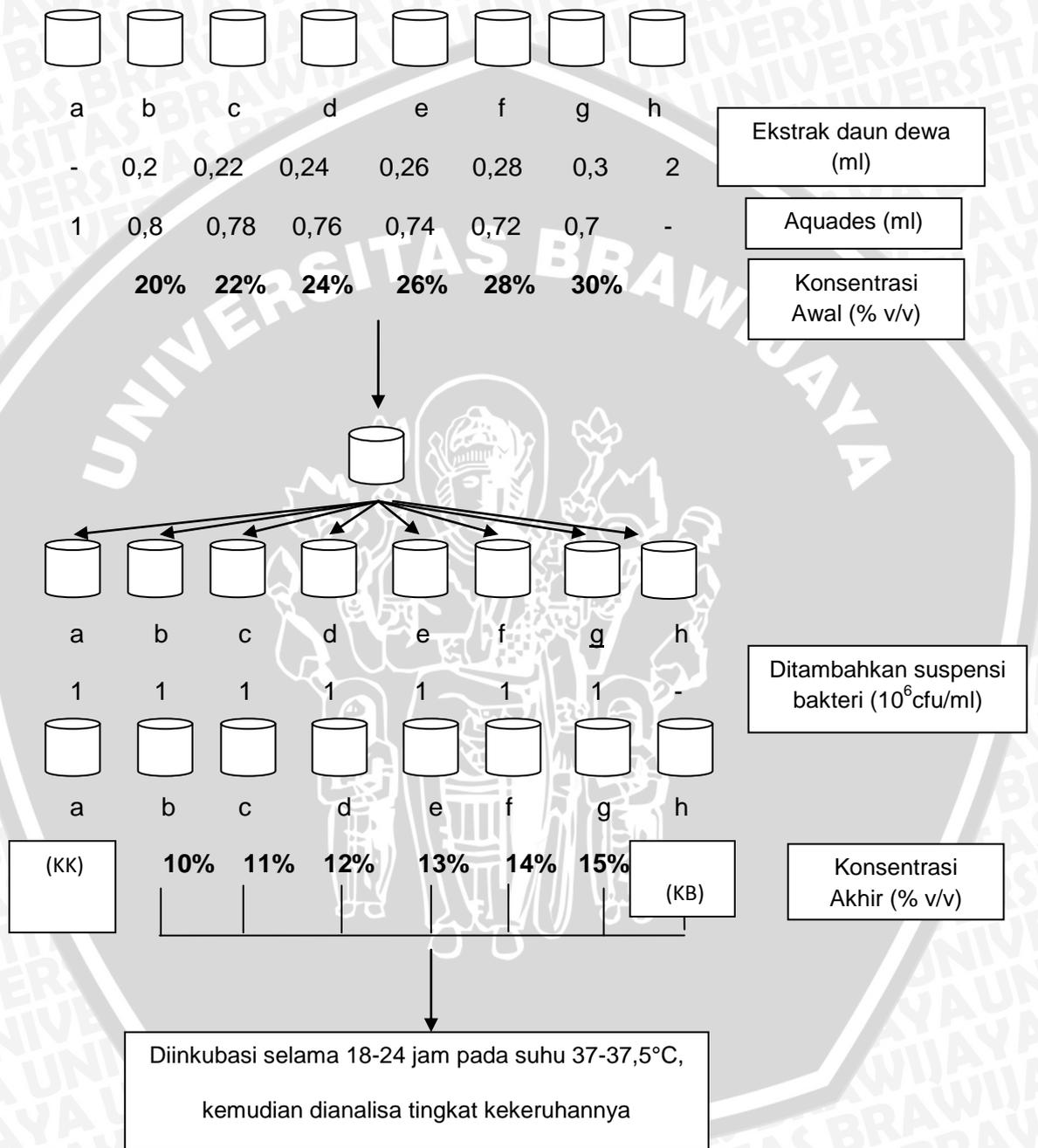
- 1) Menyediakan 8 tabung reaksi steril, diantaranya 6 tabung sebagai uji bakteri, 1 tabung sebagai kontrol positif atau kontrol kuman, dan 1 tabung sebagai kontrol negatif atau kontrol bahan.
- 2) Kemudian pada 6 tabung uji bakteri diberi label 20%, 22%, 24%, 26%, 28%, 30%
- 3) Memasukan 1 ml aquades steril dan 1 mL biakan cair *Shigella dysenteriae* dengan konsentrasi bakteri 1×10^6 CFU/ml ke dalam tabung reaksi a yang diberi label 0% (KP atau KK).
- 4) Untuk memperoleh konsentrasi ekstrak yang diinginkan, dihitung volume aquades dan larutan ekstrak daun dewa yang dibutuhkan

- Tabung b diisi aquades 0,80 mL + ekstrak daun dewa 0,20 mL sehingga mencapai konsentrasi bahan 20%
 - Tabung c diisi aquades 0,78 mL + ekstrak daun dewa 0,22 mL sehingga mencapai konsentrasi bahan 22%
 - Tabung d diisi aquades 0,76 mL + ekstrak daun dewa 0,24 mL sehingga mencapai konsentrasi bahan 24%
 - Tabung e diisi aquades 0,74 mL + ekstrak daun dewa 0,26 mL sehingga mencapai konsentrasi bahan 26%
 - Tabung f diisi aquades 0,72 mL + ekstrak daun dewa 0,28 mL sehingga mencapai konsentrasi bahan 28%
 - Tabung g diisi aquades 0,7 mL + ekstrak daun dewa 0,3 mL sehingga mencapai konsentrasi bahan 30%
- 5) Konsentrasi dan volume larutan ekstrak daun dewa a, b, c, d, f, g, h dan i berturut-turut menjadi 0%, 20%, 22%, 24%, 26%, 28%, 30%, 100%
- 6) Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi kuman 10^6 CFU/ml.
- 7) Perbenihan cair bakteri dimasukkan pada semua tabung konsentrasi (kecuali tabung 1), masing-masing sebanyak 1 ml, sehingga konsentrasi akhir bahan uji ekstrak daun dewa dalam tabung adalah:
- Tabung a: 0%
 - Tabung b: 10%
 - Tabung c: 11%
 - Tabung d: 12%
 - Tabung e: 13%
 - Tabung f: 14%

- Tabung g: 15%
 - Tabung h: 100%
- 8) Larutan tabung a (konsentrasi 0%) sebagai kontrol kuman sedangkan larutan g (konsentrasi 100%) sebagai kontrol bahan
 - 9) Masing-masing tabung divorteks dan diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
 - 10) Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. Mungkin akan didapatkan KHM dengan cara melihat kejernihan tabung dibandingkan dengan kontrol kuman dan kontrol bahan.
 - 11) Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil 1 ose dan dilakukan *streaking* sebanyak 0,01 ml pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP). Kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C.
 - 12) Pada hari ketiga didapatkan data KBM dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter* (Bailey and Scott's, 1994).

4.8.5 Alur Penelitian

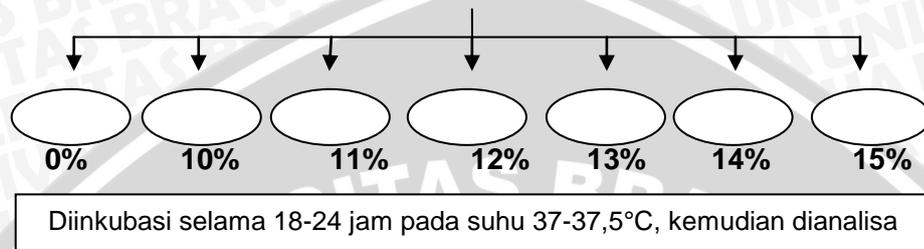
Hari 1



Hari II

Kekeruhan yang terjadi pada masing-masing tabung diamati dan ditentukan KHM.

Nilai KBM ditentukan dengan penanaman larutan konsentrasi akhir dengan metode *streaking* sebanyak 0,01 ml pada media NAP



Keterangan :

- KK : Kontrol Kuman
- KB : Kontrol Bahan
- KHM : Kadar Hambat Minimum
- KBM : Kadar Bunuh Minimum

Hari III

Dihitung jumlah koloni yang tumbuh pada NAP untuk setiap perlakuan dan diamati apakah terdapat penurunan jumlah koloni

Dibuat grafik gambaran pengaruh ekstrak daun dewa dalam berbagai konsentrasi terhadap jumlah koloni yang tumbuh pada NAP

Analisa data

4.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah uji statistik parametrik dikarenakan data hasil penelitian berupa data ratio. Uji statistik yang digunakan diantaranya adalah uji statistic komparasi One-Way ANOVA untuk mengetahui perbedaan pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun dewa (*Gynura segetum*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* sehingga dapat disimpulkan apakah ekstrak daun dewa mempunyai pengaruh antibakteri yang signifikan terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*. Apabila sebaran data tidak homogeny maka One-Way ANOVA tidak bisa digunakan, melainkan menggunakan uji komparasi Kruskal-Wallis. Selain itu, dilakukan uji Mann Whitney untuk membandingkan perilaku mana saja yang menyebabkan pertumbuhan *Shigella dysenteriae* cenderung berbeda secara signifikan atau tidak berbeda signifikan. Uji korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian ekstrak etanol daun dewa terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysenteriae*. Dalam penelitian ini, analisis statistic dilakukan dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$)