

## BAB IV

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorium (*true experimental-post test only control group design*) melalui metode sumuran untuk menentukan zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol daun lidah mertua dan sampel bakteri uji yang digunakan pada penelitian adalah *Pseudomonas aeruginosa* yang diambil dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Ekstraksi bahan penelitian dilakukan di Materia Medika Batu pada bulan Juni 2014 dan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada rentang waktu September 2014 – November 2014.

#### 4.4 Pengulangan

Jumlah pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan rumus  $p(n - 1) \geq 15$  dengan  $n$  = jumlah pengulangan tiap perlakuan;  $p$  = jumlah perlakuan (Lukito, 1998). Terdapat 6 perlakuan pada penelitian ini, sehingga estimasi besar sampel adalah

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3.5 \approx 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka besar sampel atau pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4.

#### 4.5 Variabel Penelitian

##### 4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun lidah mertua dengan konsentrasi tertentu, yaitu 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%.

##### 4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah diameter zona inhibisi yang tampak di sekitar lubang sumuran.

#### 4.6 Definisi operasional

4.6.1 Daun lidah mertua yang digunakan berwarna hijau dengan pinggir kuning cerah. Tanaman ini didapatkan dari Materia Medika Batu.

- 4.6.2 Ekstrak daun lidah mertua menggunakan pelarut etanol 96% yang diproses dengan ekstraksi metode maserasi.
- 4.6.3 *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan pada penelitian ini berasal dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- 4.6.4 Zona inhibisi adalah zona bening yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dan menunjukkan bahwa bahan antimikroba dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin lebar zona inhibisi maka semakin rentan bakteri tersebut terhadap ekstrak etanol daun lidah mertua. Diameter zona inhibisi diukur dalam satuan milimeter (mm).
- 4.6.5 Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%.
- 4.6.6 Pengenceran ekstrak etanol daun lidah mertua dilakukan dengan menggunakan aquades.

#### **4.7 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Lidah Mertua**

1. Alat
  - a. Oven
  - b. Timbangan
  - c. Gelas erlenmeyer
  - d. Kertas saring
  - e. Pendingin spiral/*rotatory evaporator*
  - f. Labu penampang etanol
  - g. Labu evaporator

- h. Selang *water pump*
- i. *Water pump*
- j. *Water bath*
- k. *Vacum pump*

2. Bahan

- a. Daun lidah mertua
- b. Pelarut etanol 96%
- c. Aquades

#### 4.7.2 Alat dan bahan untuk Identifikasi bakteri

1. Alat

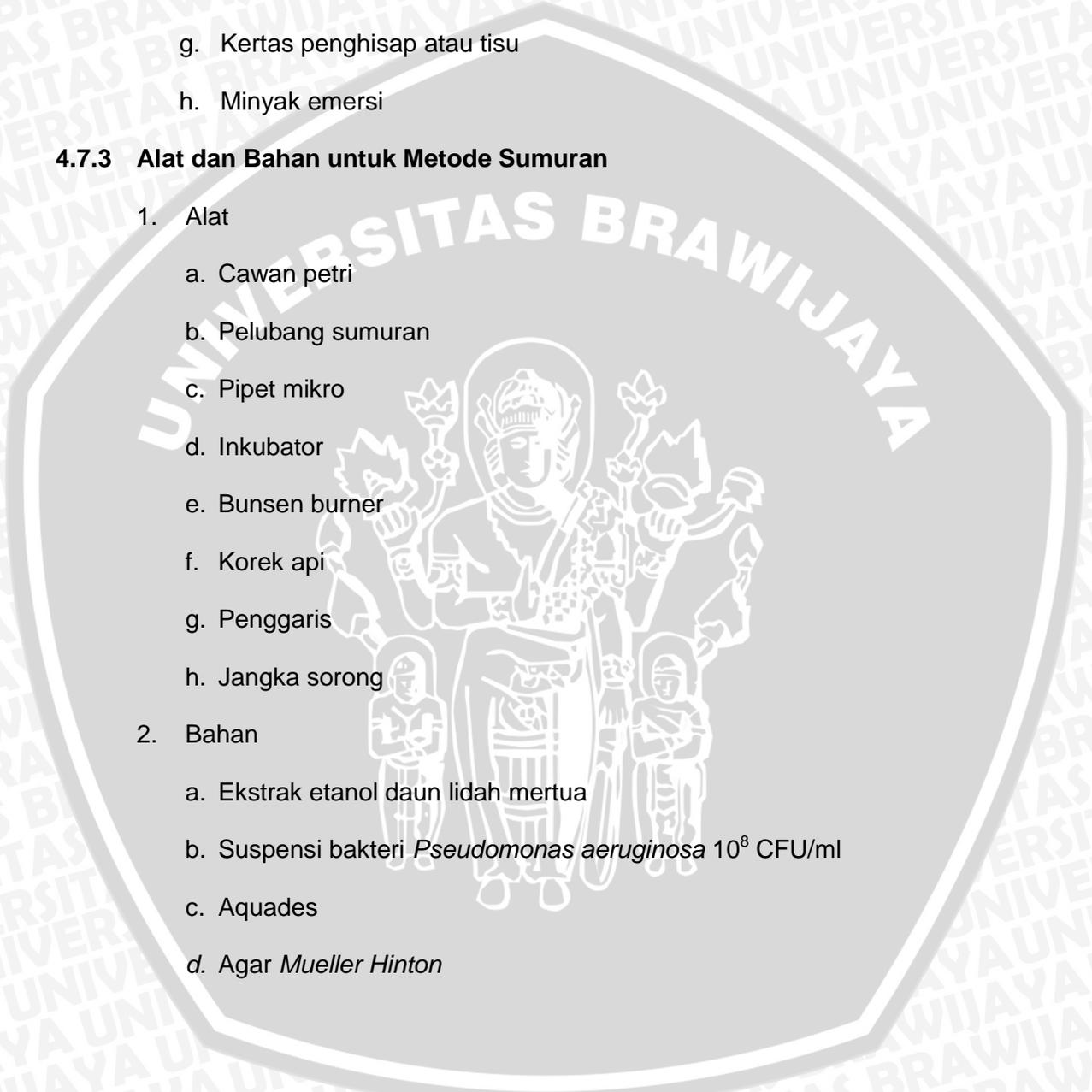
- a. Tabung reaksi
- b. Ose
- c. Lampu spiritus dan bunsen
- d. Inkubator
- e. Spektrofotometer
- f. Korek api
- g. Label
- h. Kertas filter
- i. Larutan reagen tetramethyl p- phenylenediamine dichloride 1%
- j. Obyek glass dan kaca penutup
- k. Mikroskop

2. Bahan

- a. *Pseudomonas aeruginosa*
- b. Medium *Mueller-Hinton Agar (MH Agar) Plate*
- c. Medium *MacConkey*

- d. Suspensi bakteri dari *Mueller-Hinton Broth (MH Broth)*
- e. Bahan pewarnaan gram : kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin
- f. Akuades steril
- g. Kertas penghisap atau tisu
- h. Minyak emersi

#### 4.7.3 Alat dan Bahan untuk Metode Sumuran

1. Alat
    - a. Cawan petri
    - b. Pelubang sumuran
    - c. Pipet mikro
    - d. Inkubator
    - e. Bunsen burner
    - f. Korek api
    - g. Penggaris
    - h. Jangka sorong
  2. Bahan
    - a. Ekstrak etanol daun lidah mertua
    - b. Suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*  $10^8$  CFU/ml
    - c. Aquades
    - d. Agar *Mueller Hinton*
- 

## 4.8 Prosedur penelitian

### 4.8.1 Identifikasi bakteri

#### a. Pewarnaan Gram (Brooks *et al.*, 2007)

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui *Pseudomonas aeruginosa* termasuk bakteri Gram positif atau Gram negatif. Prosedur pewarnaan Gram, sebagai berikut.

1. Gelas obyek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api lalu dibiarkan dingin.
2. Satu tetes akuades steril diteteskan pada gelas obyek.
3. Dengan ose jarum yang steril, diambil sedikit bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang tumbuh pada medium padat kemudian disuspensikan dengan satu tetes akuades steril atau larutan *saline* yang sudah diteteskan terlebih dulu pada gelas obyek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.
4. Hapusan dibiarkan kering di udara. Setelah kering hapusan difiksasi dengan cara melewati sediaan sebanyak tiga kali di atas api. Sediaan siap diwarnai.
5. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama satu menit. Kemudian sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.
6. Sediaan dituangi dengan lugol dan ditunggu selama satu menit setelah itu sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.

7. Sediaan dituangi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.
8. Sediaan dituangi safranin dan ditunggu selama 30 detik, kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
9. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak imersi lalu dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 97-100x.
10. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang teramati di bawah mikroskop berupa bakteri berbentuk batang dan berwarna merah. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* mengambil warna pembanding safranin yang berwarna merah sehingga termasuk dalam golongan bakteri Gram negatif.

b. Tes Oksidase

Biakan pada *MacConkey* diambil satu ose, kemudian dilakukan tes oksidase. Prosedur tes oksidase adalah sebagai berikut.

1. Pada penelitian ini dilakukan tes oksidase metode kertas filter
2. Kertas filter dibasahi dengan larutan reagen *tetramethyl p-phenylenediamine dichloride* 1%.
3. Bakteri yang diperiksa, digoreskan dengan ose platina/batang gelas pada kertas tersebut.
4. Tes positif apabila warna goresan tersebut menjadi ungu sampai hitam dalam waktu  $\frac{1}{2}$  - 1 menit.

c. Kultur untuk Identifikasi Bakteri

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat diidentifikasi dengan melakukan kultur pada beberapa media, sebagai berikut.

1. Pada penelitian ini dilakukan tes identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* dengan melakukan *streaking* (penggoresan) bakteri pada medium *Mueller Hinton Agar* dan *MacConkey*.
2. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>-42<sup>0</sup>C selama 18-24 jam dan dilihat penampakan koloni bakteri pada medium.
3. Koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada medium *Mueller Hinton Agar* berwarna hijau karena memproduksi pigmen piosianin. Bakteri tetap tumbuh pada suhu 42<sup>0</sup>C.
4. Koloni *Pseudomonas aeruginosa* tidak memfermentasi laktosa sehingga *colorless* di medium *MacConkey*.

d. *Microbact* 12A/E-24E

Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* juga dapat dilakukan dengan menggunakan *Microbact* 12A/E-24E, sebagai berikut.

1. Sebelum ditentukan menggunakan 12A/12E atau 24E, koloni bakteri dilakukan uji oksidase, jika hasil oksidase negatif menggunakan *Microbact system* 12A/12E saja, sedangkan jika hasil oksidase positif maka menggunakan 24E.
2. Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan ke dalam 5 ml NaCl 0,9% pada tabung reaksi steril dan divorteks hingga homogen.
3. Larutan bakteri yang telah homogen diteteskan ke dalam sumur *microbact* sebanyak 100 UI (4 tetes), untuk sumur lysin, ornitin dan

H<sub>2</sub>S ditambah dengan tetesan mineral oil sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu microbact diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

4. *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan 2 tetes reagen Nitrat 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 menunjukkan warna kuning, sedangkan hasil negatif tidak ada perubahan warna sehingga tetap biru.
  6. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *Microbact* apakah positif atau tetap negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan ditulis pada formulir *Patient Record*.
  7. Angka-angka *oktal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*).
  8. Nama spesies bakteri dilihat dengan *software microbact system* di komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat.
- e. Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri Kepadatan 10<sup>8</sup> CFU/ml
- Perbenihan cair bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan kepadatan 10<sup>8</sup> CFU/ml dibuat dengan cara sebagai berikut.
1. Bakteri dengan karakteristik sama diambil dari lempeng *Mueller-Hinton Broth* kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutriet Broth*.

2. Tabung reaksi lalu diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. Dilakukan spektrofotometri pada tabung reaksi di atas dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui *Optical Density* (OD) dari suspensi.
4. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10<sup>8</sup> CFU/ml (sesuai standar McFarland 0.5) yang setara dengan OD=0.1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut.

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

Keterangan:

$N_1$  = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

$V_1$  = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

$N_2$  = *Optical Density* (0,1 = setara dengan 10<sup>8</sup> CFU/ml)

$V_2$  = Volume suspensi bakteri (10 ml)

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

#### 4.8.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Lidah Mertua

Pembuatan ekstrak etanol daun lidah mertua dilakukan dalam beberapa tahap sebagai berikut (Gitasari, 2011).

- a. Daun lidah mertua yang digunakan memiliki daun berwarna hijau dengan pinggiran kuning yang masih segar. Daun dipotong kecil-kecil dan dicuci bersih dengan air kemudian dikeringkan dengan oven suhu

60°C selama 3x24 jam. Bahan yang sudah dioven ditimbang sebanyak 100 gram lalu dihaluskan sampai berubah menjadi serbuk menggunakan blender.

- b. 100 gram hasil yang telah diblender lalu dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter lalu direndam dengan etanol 96% sampai volume 1000 cc.
- c. Dikocok hingga benar-benar tercampur kurang lebih selama 30 menit dan dibiarkan selama satu malam agar mengendap.
- d. Setelah itu, lapisan paling atas dari larutan campuran etanol 96% dan daun lidah mertua diambil dan diletakkan dalam gelas ekstraksi kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotatory evaporator*.
- e. Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30-40 derajat terhadap meja percobaan, dengan susunan dari bawah ke atas yaitu, alat pemanas air, labu penampung hasil, *rotatory evaporator* dan tabung pendingin.
- f. Tabung pendingin dihubungkan dengan alat pompa sirkulasi air dingin dengan bak penampung air dingin melalui pipa plastik, tabung pendingin juga dihubungkan dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.
- g. Labu penampung hasil evaporasi diisi dengan hasil ekstraksi dan kemudian dirangkai kembali.
- h. *Rotatory evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan.

- i. Pemanas aquades juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi ikut mendidih dan pelarut etanol mulai menguap.
- j. Hasil penguapan etanol akan dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tercampur dengan hasil evaporasi, sedangkan uap lain tersedot pompa vakum.
- k. Setelah kental, maka proses evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil.
- l. Setelah evaporasi selesai, ekstrak kemudian dioven kembali dengan suhu 80° C selama 2 jam karena titik rendah etanol adalah 78° C. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa etanol 96% yang mungkin masih tersisa dalam ekstrak.

#### 4.8.3 Uji Sensitivitas Antimikroba

Penelitian pendahuluan dilakukan terlebih dahulu dengan menggunakan konsentrasi 0%, 12.5%, 25%, 50% dan 100%. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa zona inhibisi mulai terbentuk di sekitar lubang sumuran pada konsentrasi 50% (Lampiran 1). Berdasarkan hasil tersebut, maka dalam menguji sensitivitas antimikroba ekstrak etanol daun lidah mertua terhadap *Pseudomonas aeruginosa* digunakan variasi konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%. Rangkaian uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun lidah mertua menggunakan metode sumuran adalah sebagai berikut (Selvamohan *et al.*, 2012).

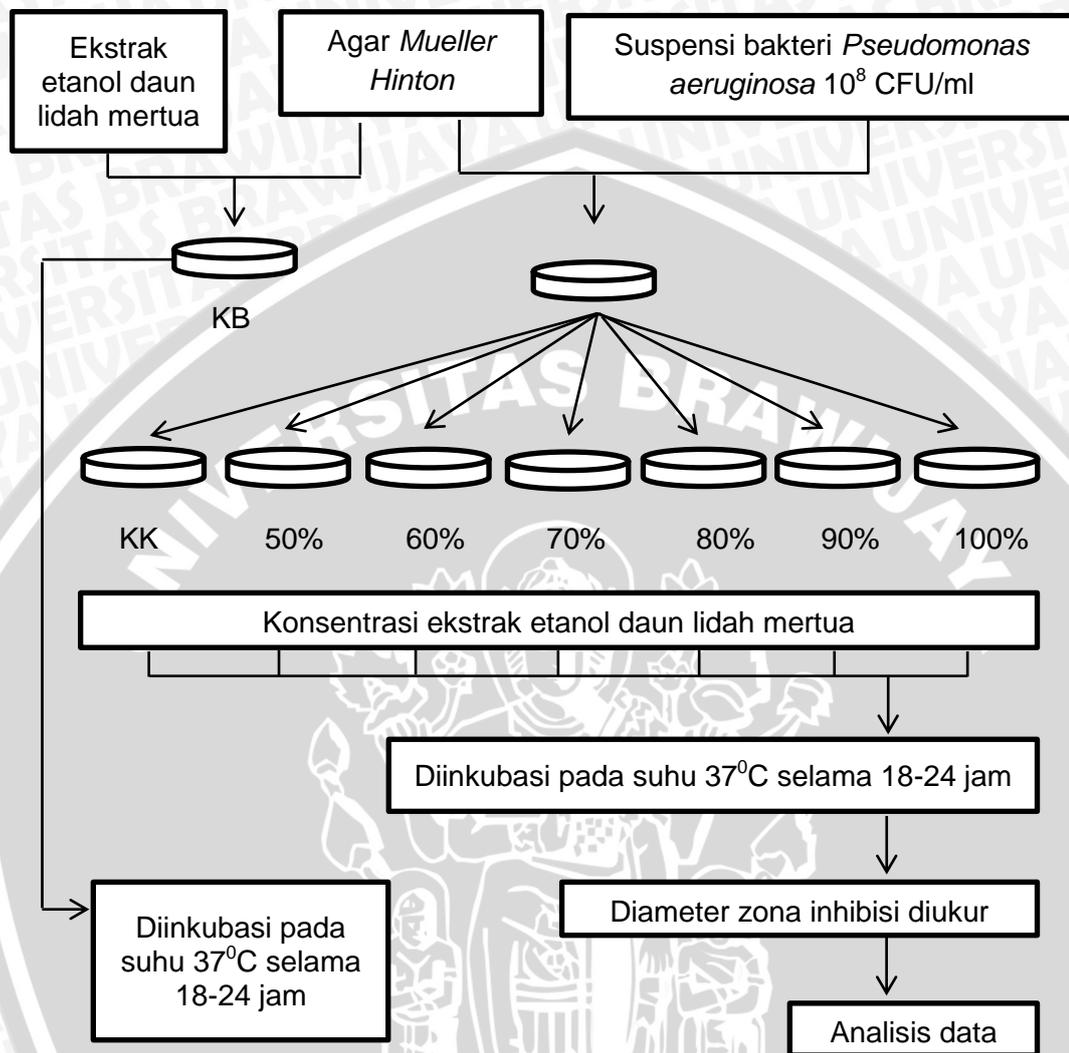
- a. Alat dan bahan disiapkan. Cawan petri sebanyak 8 buah dengan rincian, 1 untuk Kontrol Kuman (KK), 1 untuk Kontrol Bahan (KB) dan

- 6 cawan petri lainnya diberikan tanda untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun lidah mertua yang akan dimasukkan.
- Suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*  $10^8$  CFU/ml dicampurkan dengan agar cair *Mueller Hinton* sebanyak 15 ml dalam cawan petri.
  - Cawan petri digoyang-goyangkan sehingga campuran tercampur dengan baik, lalu didiamkan beberapa saat hingga mengeras.
  - Campuran agar *Mueller Hinton* dan suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*  $10^8$  CFU/ml dibagi empat dengan menggunakan penggaris.
  - Lubang sumuran dibuat pada keempat sisi campuran agar *Mueller Hinton* dan suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*  $10^8$  CFU/ml yang telah dibagi sebelumnya, dengan menggunakan pelubang sumuran.
  - Ekstrak etanol daun lidah mertua tidak dimasukkan ke dalam lubang sumuran di cawan petri yang telah disediakan, sebagai Kontrol Kuman (KK). Sedangkan Kontrol Bahan (KB) dibuat dengan mencampurkan agar *Mueller Hinton* dan ekstrak etanol daun lidah mertua.
  - Konsentrasi ekstrak etanol daun lidah mertua dengan konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% sebanyak 100 mikroliter dimasukkan pada tiap-tiap cawan petri yang telah ditandai.
  - Cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator selama 18-24 jam dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .

- i. Mengukur diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm).



#### 4.8.4 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Skema alur uji antimikroba ekstrak etanol daun lidah mertua terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

Ket : CFU : Colony Forming Unit

KK : Kontrol Kuman

KB : Kontrol Bahan

#### 4.9 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan variabel numerik dengan satu faktor yang ingin diketahui yaitu perbedaan ukuran zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran berdasarkan faktor perlakuan pemberian ekstrak etanol daun lidah mertua. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) untuk windows versi 17 (Dahlan, 2008). Adapun langkah-langkah pengujian sebagai berikut.

1. Uji normalitas data dengan menggunakan *Kolmogorov Smirnov test* untuk menguji apakah data tersebar normal (parametrik) atau tidak tersebar normal (non parametrik).
2. Uji komparasi dilakukan dengan cara *One-Way ANOVA* > 2 kelompok untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol daun lidah mertua terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*, dengan syarat:
  - a. Sebaran data harus normal
  - b. Varian data harus sama (homogen)

Namun, jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka digunakan metode *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan ukuran zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran pada setiap perlakuan yang disebabkan oleh pemberian ekstrak etanol daun lidah mertua.

3. Uji *Mann-Whitney*, dilakukan untuk mengetahui pasangan kelompok sampel yang memberikan perbedaan yang signifikan.
4. Uji Korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara variabel dependen dan variabel independen. Jika, data parametrik maka digunakan Uji Korelasi *Pearson*, sedangkan data non parametrik akan diuji dengan Uji Korelasi *Spearman*. Uji korelasi dilakukan untuk

mengetahui hubungan konsentrasi pemberian ekstrak etanol daun lidah mertua dan efeknya.

