

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental dengan desain *post test control group* yang menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun katuk yang dapat mempengaruhi isolat bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*. Metode dilusi tabung meliputi dua tahap pengujian bahan pada medium broth untuk menentukan KHM, serta tahap penggoresan pada medium *NAP (Nutrient Agar Plate)* untuk mengetahui KBM.

4.2 Jumlah Pengulangan

Pada penelitian ini digunakan sampel berupa bakteri *Shigella dysenteriae* dengan kepadatan 10^6 CFU/ml yang dikembangbiakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sampel diperoleh dari spesimen berupa feses pasien di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang.

Banyaknya sampel diatas dihitung dengan menggunakan rumus (Solimun, 2001):

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

Keterangan:

p = jumlah perlakuan (terdiri dari tujuh macam perlakuan/konsentrasi)

n = jumlah sampel

Penelitian ini menggunakan 6 konsentrasi dari ekstrak etanol daun katuk dan 1 kontrol bakteri tanpa diberi ekstrak etanol daun katuk, sehingga p = 7 maka didapatkan jumlah pengulangan:

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,1 \approx 4$$

Dengan demikian, pada penelitian ini diperlukan 4 kali pengulangan.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus*) dengan konsentrasi 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5% dan 8%.

4.3.2 Variabel Tergantung

Koloni bakteri *Shigella dysenteriae* pada medium *Mac Conkey*

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada tanggal 28 Oktober 2014 s.d November 2014.

Bahan daun katuk diperoleh dari Materia Medika Batu. Tempat ekstraksi di Polinema Negeri Malang.

4.5 Definisi Operasional

a. Ekstrak etanol daun katuk adalah :

Hasil ekstraksi daun katuk yang berwarna hijau tua yang didapatkan dari Balai Materia Medika, Batu, Malang dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 96%.

b. Isolat *Shigella dysenteriae* adalah :

Bakteri *Shigella dysenteriae* isolat 1109-AB satu isolat yang diperoleh dari feses pasien penderita disentri di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang kemudian dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB.

c. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah :

Konsentrasi ekstrak etanol daun katuk terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang ditandai dengan kejernihan dalam tabung.

d. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah :

Konsentrasi ekstrak etanol daun katuk terendah yang mampu membunuh bakteri *Shigella dysenteriae* yang dapat dilihat dari tidak adanya koloni yang tumbuh pada agar plate atau jumlah koloni kurang dari 0,1% dari jumlah koloni pada *original inoculum* (OI).

e. *Original inoculum* (OI) adalah :

Inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi dan digunakan untuk menentukan kategori KBM.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

Alat yang digunakan untuk identifikasi dan tes kepekaan bakteri *Shigella dysenteriae* adalah Cawan petri, Ose, Tabung reaksi, Labu Erlenmeyer, Termometer, Inkubator, Gelas obyek, Cover glass, Bunsen, Korek api, Spidol permanen, Pipet steril 10 ml, Penggaris, Mikroskop, dan *Colony Counter*.

Alat pembuatan ekstrak etanol daun katuk yaitu Timbangan analitik, oven, blender, shaker, *rotary evaporator vaccum*, penyaring buchner, gelas ukur 10 ml, erlenmeyer 500 ml, erlenmeyer 1 L, beacker glass, tabung reaksi, mikro pipet, pengaduk kaca, kertas saring/whatman, aluminium foil.

4.6.2 Bahan

Bahan untuk identifikasi *Shigella dysenteriae* yaitu minyak emersi, H₂O₂ 3%, serum plasma mamalia, bahan pewarna Gram (kristal violet, lugol, alkohol 70%, safranin), aquadest, kertas penghisap, Mac Conkey agar, Triple Sugar Iron (TSI) agar.

Bahan untuk pembuatan ekstrak etanol daun katuk yaitu daun katuk etanol 96%, *aquadest* steril. Bahan uji kepekaan ekstrak etanol daun katuk terdiri dari empat isolat *Shigella dysenteriae*, ekstrak etanol daun katuk, *Nutrient Broth*, NAP (*Nutrient Agar Plate*), NaCl, dan aquades steril.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Penelitian Pendahuluan

Sebelum dosis konsentrasi ditentukan, dilakukan eksplorasi (penelitian pendahuluan) terlebih dahulu. Penelitian pertama dilakukan dengan memakai

konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 0%. Hasil pengamatan menunjukkan pada konsentrasi 25% dan 50% pada NAP sudah tidak ditumbuhi oleh koloni bakteri *Shigella dysenteriae* dan pada konsentrasi 0% dan 12,5 % pada NAP ditumbuhi banyak koloni *Shigella dysenteriae*. Oleh karena itu pada penelitian selanjutnya dipakai konsentrasi 25%, 22,5%, 20%, 17,5%, 15%, 12,5% dan 0%.

Hasil penelitian kedua menunjukkan bahwa tidak ada koloni yang tumbuh di Nutrient Agar Plate pada konsentrasi 25%, 22,5%, 20%, 17,5% dan 15%. Untuk uji antimikroba daun katuk (*Sauropus androgynus*) terhadap *Shigella dysenteriae* selanjutnya digunakan dosis konsentrasi dasar 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5% dan 8%.

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Katuk

4.7.2.1 Proses Metode Maserasi

- Daun katuk segar dicuci dengan air bersih, kemudian dijemur hingga layu.
- Pengeringan kemudian dilanjutkan dengan menggunakan alat oven yang diatur suhunya sampai 60°C selama 12 jam.
- Simplisia daun katuk kering sebanyak 200 gram dilarutkan dengan pelarut etanol (EtOH) 96% sebanyak 600 ml.
- Rendam bahan dan diamkan pada suhu kamar selama minimal 2 x 24 jam dengan sesekali diaduk
- Proses maserasi diulangi sampai filtrat jernih
- Setelah maserasi, maserat disaring dengan menggunakan kertas saring *whatman*.

- Filtrat dari penyaringan ini kemudian dievaporasikan dengan menggunakan *rotary-evaporator* pada temperatur 40°C. Dari hasil ekstraksi ini diperoleh ekstrak etanol.

4.7.2.2 Proses Evaporasi dengan *rotary-evaporator vacum*

- Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja.
- Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu ekstraksi.
- Satu set alas evaporasi diletakkan sedemikian rupa sehingga sebagian labu ekstraksi terendam aquades pada *water bath*.
- *Water bath* dihubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhunya sampai 78° C, sesuai dengan titik didih etanol (Buckley, 2006).
- Ditunggu proses bedalan (pengembunan dan pemisahan di pendingin) sampai hasil evaporasi tersisa dalam labu ekstraksi.
- Hasil evaporasi berupa cairan berwarna hijau kehitaman dan tidak terdapat endapan. Dalam penelitian ini, hasil evaporasi adalah ekstrak daun katuk dengan konsentrasi 100%.

4.7.3. Identifikasi Bakteri *Shigella dysenteriae*

Untuk mengidentifikasi bakteri *Shigella dysenteriae*, pertama-tama 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. Tahap selanjutnya, melakukan uji identifikasi bakteri, dengan pewarnaan Gram, kultur pada medium Diferensial *Mac Conkey* serta Triple Sugar Iron Agar.

4.7.3.1 Pewarnaan Gram

Langkah-langkah melakukan pewarnaan Gram adalah sebagai berikut.

- Gelas obyek dibersihkan dengan menggunakan kapas steril. Lewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak, lalu biarkan dingin.
- Teteskan satu tetes *aquades* steril pada gelas obyek.
- Ambil sedikit koloni *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada medium agar dengan menggunakan jarum ose yang sudah disterilkan dengan pembakaran. Lalu disuspensikan dengan satu tetes *aquades* steril yang sudah ditetaskan terlebih dahulu pada gelas obyek.
- Tuangi sediaan dengan kristal violet selama 1 menit, kemudian buang dan bilas dengan air.
- Tuangi sediaan dengan lugol selama 1 menit, kemudian buang dan bilas dengan air.
- Tuangi sediaan dengan alkohol 70% sampai warna luntur sekitar 5-10 detik, kemudian buang dan bilas dengan air.
- Tuangi sediaan dengan safranin selama 30 detik, kemudian buang dan bilas dengan air.
- Keringkan sediaan dengan kertas penghisap
- Lihat di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa obyektif 100x. Hasil positif: *Shigella dysenteriae* berbentuk batang dan berwarna merah (bersifat Gram negatif).

4.7.3.2 Kultur pada Medium Diferensiasi *Mac Conkey*

Dilakukan inokulasi bakteri *Shigella dysenteriae* dengan metode streaking pada medium *Mac Conkey* agar. Inkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya. Hasil positif : ditemukan morfologi koloni bakteri *Shigella dysenteriae* yang berbentuk oval, permukaannya datar dan halus, tepi tidak rata, tidak berbau dan khas didapatkan koloninya berwarna pucat (non lactose fermenter).

4.7.3.3 Triple Sugar Iron Agar

Dengan menggunakan ose, *Shigella dysenteriae* ditanam dengan cara menusuk sampai dekat dasar tabung, kemudian menggoreskan ose tersebut secara zig-zag pada permukaan media. Tabung tidak boleh ditutup rapat. Kemudian inkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya. Hasil positif : *Shigella dysenteriae* meragikan glukosa, sehingga terbentuk dasar (butt) asam dan cekungan (slant) alkali pada TSI atau dapat dituliskan Alk/As. Bakteri ini tidak menghasilkan gas maupun H₂S.

4.7.4 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Persiapan suspensi uji *Shigella dysenteriae* dapat dilakukan sebagai berikut:

- Ambil 5 koloni *Shigella dysenteriae* dengan karakteristik sama dari lempeng agar *Mac Conkey* dengan menggunakan ose.
- Masukkan ke dalam tabung reaksi steril berisi *Nutrient broth*, tabung reaksi lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- Kemudian lakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625 nm, untuk mengetahui OD dari suspensi tersebut.

- d. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/mL yang setara dengan OD = 0,1 (Murray *et al.*, 1999), dilakukan perhitungan sebagai berikut:

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

Keterangan:

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

N_2 = OD (setara dengan 10^8 CFU/ml)

- e. Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL sebanyak 10 mL.
- f. Dari 10 mL bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL, diambil 1 mL larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml aquades steril sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^7 CFU/mL.
- g. Diambil 1 ml larutan dengan konsentrasi bakteri 10^7 CFU/mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml aquades steril sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/mL.

4.7.5 Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Katuk

Rangkaian uji antibakteri Ekstrak Etanol Daun Katuk adalah sebagai berikut:

- 1) Disediakan 8 tabung steril, beri tanda 0%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16% dan KB (kontrol bahan). Konsentrasi

ekstrak 0% adalah biakan *Shigella dysenteriae* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml, sedangkan kontrol bahan adalah ekstrak etanol daun katuk.

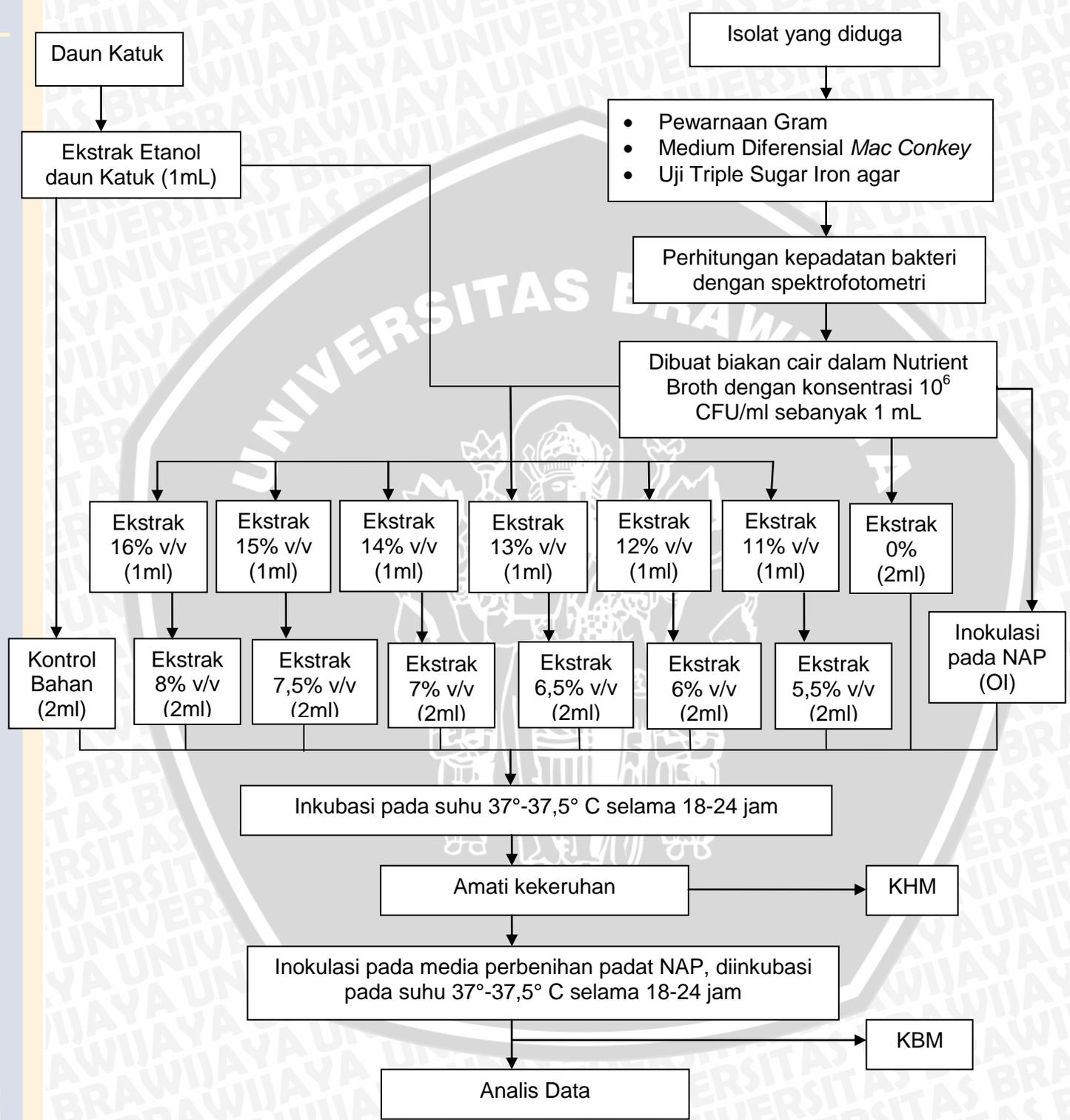
- 2) Memasukan 1 ml aquades steril dan 1 mL biakan cair *S. Typhi* dengan konsentrasi bakteri 1×10^6 CFU/ml ke dalam tabung reaksi 1 yang diberi label 0% (KP atau KK).
- 3) 0,89 ml aquades steril dimasukkan ke dalam tabung bertanda 5,5 %, lalu ditambahkan 0,11 ml ekstrak etanol daun katuk.
- 4) 0,88 ml aquades steril dimasukkan ke dalam tabung bertanda 6 %, lalu ditambahkan 0,12 ml ekstrak etanol daun katuk.
- 5) 0,87 ml aquades steril dimasukkan ke dalam tabung bertanda 6,5 %, lalu ditambahkan 0,13 ml ekstrak etanol daun katuk.
- 6) 0,86 ml aquades steril dimasukkan ke dalam tabung bertanda 7 %, lalu ditambahkan 0,14 ml ekstrak etanol daun katuk.
- 7) 0,85 ml aquades steril dimasukkan ke dalam tabung bertanda 7,5 %, lalu ditambahkan 0,15 ml ekstrak etanol daun katuk.
- 8) 0,84 ml aquades steril dimasukkan ke dalam tabung bertanda 8 %, lalu ditambahkan 0,16 ml ekstrak etanol daun katuk.
- 9) 0,78 ml aquades steril dimasukkan ke dalam tabung bertanda 11%, lalu ditambahkan 0,22 ml ekstrak etanol daun katuk.
- 10) 0,76 ml aquades steril dimasukkan ke dalam tabung bertanda 12%, lalu ditambahkan 0,24 ml ekstrak etanol daun katuk.
- 11) 0,74 ml aquades steril dimasukkan ke dalam tabung bertanda 13%, lalu ditambahkan 0,26 ml ekstrak etanol daun katuk.

- 12) 0,72 ml aquades steril dimasukkan ke dalam tabung bertanda 14%, lalu ditambahkan 0,28 ml ekstrak etanol daun katuk.
- 13) 0,7 ml aquades steril dimasukkan ke dalam tabung bertanda 15%, lalu ditambahkan 0,3 ml ekstrak etanol daun katuk.
- 14) 0,68 ml aquades steril dimasukkan ke dalam tabung bertanda 16%, lalu ditambahkan 0,32 ml ekstrak etanol daun katuk.
- 15) 1 ml aquades steril dimasukkan ke dalam tabung bertanda konsentrasi ekstrak 0%.
- 16) 1 ml biakan cair *Shigella dysenteriae* ditambahkan ke dalam setiap tabung kecuali tabung kontrol bahan.
- 17) 2 ml ekstrak etanol daun katuk dimasukkan ke dalam tabung bertanda kontrol bahan.
- 18) Dari tabung reaksi 1, mengambil larutan sebanyak 1 ose kemudian dilakukan penggoresan pada NAP untuk membuat *original inoculum*.
- 19) Masing-masing tabung di-vortex dan diinkubasikan pada suhu 37°-37,5° C selama 18-24 jam.
- 20) Setelah 18-24 jam perhatikan dan catat derajat kekeruhan pada semua tabung. Cara membaca derajat kekeruhan adalah dengan meletakkan sebuah kertas putih di belakang tabung, dimana sebelumnya pada kertas tersebut digambar sebuah garis hitam, kemudian perhatikan garis hitam dari depan tabung. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM.

- 21) Untuk mengetahui KBM, dilakukan penggoresan pada media NAP, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°-37,5° C selama 18-24 jam.
- 22) Setelah 18-24 jam hitung jumlah koloni *Shigella dysenteriae* yang tumbuh dengan *colony counter*, konsentrasi terendah dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% dari *original inoculum* adalah KBM.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA





Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

4.8 Pengumpulan Data

Data didapatkan dengan cara kualitatif dan kuantitatif. Cara kualitatif pada pengamatan dengan melihat apakah ada pertumbuhan bakteri atau tidak secara tidak langsung dengan mengamati kekeruhan yang terjadi setelah sebelumnya didiamkan 18-24 jam, sedangkan cara kuantitatif dengan melihat adanya pertumbuhan koloni pada NAP dari subkultur larutan uji yang tidak menunjukkan kekeruhan.

4.8 Analisis Data

Analisa data yang digunakan adalah uji statistik One-Way ANOVA dan uji statistik korelasi-regresi. Dengan menggunakan One-Way ANOVA, maka akan diketahui perbedaan jumlah koloni pada setiap perlakuan konsentrasi ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus*) terhadap *Shigella dysenteriae*. Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk menentukan besarnya pengaruh serta arah hubungan antara konsentrasi ekstrak daun katuk terhadap pertumbuhan *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*. Syarat untuk menggunakan uji One-Way ANOVA adalah distribusi data harus normal dan varians data harus homogen. Analisis data dilakukan pada derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).