

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *True Experimental-Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak etanol daun turi merah (*Sesbania grandiflora* L. Pers) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Proses ekstraksi daun turi merah menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Uji kepekaan antibakteri dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan metode dilusi agar (*Agar Dilution Test*). Dalam metode dilusi agar ini, hanya terdapat satu tahap yaitu tahap pengujian ekstrak pada media *Nutrient Agar Plate* untuk menentukan kadar hambat minimal (KHM).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 03 Agustus 2015 sampai 02 September 2015 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* Isolat 100-SV yang diperoleh dari swab vagina milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Pengulangan

Besarnya sampel yang diperlukan dalam penelitian ini dihitung melalui rumus (Dewi, *dkk.*, 2013):

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

Keterangan: t = jumlah kelompok perlakuan (konsentrasi ekstrak)
n = jumlah pengulangan yang diperlukan pada tiap perlakuan

Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan 5 macam konsentrasi dan 1 kontrol bakteri. Jumlah kelompok perlakuan adalah 6 konsentrasi ekstrak. Sehingga didapatkan jumlah pengulangan sebagai berikut :

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

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah pengulangan pada tiap perlakuan adalah empat kali pengulangan.

4.5 Variabel Penelitian

Ada dua macam variabel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu variabel bebas dan variabel tergantung.

4.5.1 Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Pada penelitian ini variabel bebas terdiri dari beberapa konsentrasi ekstrak etanol daun turi merah (*Sesbania grandiflora* L. Pers) yang akan diuji yaitu 0% (kontrol bakteri), 10%, 11%, 12%, 13%, dan 14%. Konsentrasi tersebut ditetapkan melalui penelitian pendahuluan.

4.5.2 Variabel Tergantung (*Dependent Variable*)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus* dengan melihat secara langsung pada *plate* untuk menentukan KHM.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat dengan nomor 100-SV yang berasal dari swab vagina milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Bawijaya Malang.

4.6.2 Ekstrak etanol daun turi merah dibuat dengan mengolah daun turi merah menjadi bubuk kering terlebih dahulu, kemudian dijadikan ekstrak kental menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% di Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang.

4.6.3 Uji kepekaan antibakteri metode dilusi agar (*Agar Dilution Test*) adalah uji kepekaan yang dilakukan secara *in vitro* dengan mencampur ekstrak menggunakan konsentrasi yang berbeda ke dalam media agar, kemudian ditetesi dengan perbenihan cair yang telah mengandung bakteri dengan jumlah yang telah distandardisasi (10^6 CFU/ml).

- 4.6.4** Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0% (kontrol bakteri), 10%, 11%, 12%, 13%, dan 14%. Besarnya konsentrasi tersebut ditetapkan melalui penelitian pendahuluan.
- 4.6.5** Kontrol bakteri adalah ekstrak etanol daun turi merah dengan konsentrasi 0% pada *plate* untuk membedakan pertumbuhan bakteri yang normal dengan pertumbuhan bakteri yang diberikan perlakuan.
- 4.6.6** Kadar hambat minimal (KHM) merupakan konsentrasi terendah ekstrak etanol daun turi merah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. KHM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri pada semua pengulangan.
- 4.6.7** Penilaian pertumbuhan koloni bakteri dinyatakan dalam bentuk *scoring* yaitu +5, +4, +3, +2, +1, dan 0. +5 berarti terdapat pertumbuhan koloni bakteri yang sangat tebal, +4 berarti terdapat pertumbuhan koloni bakteri yang tebal, +3 berarti terdapat pertumbuhan koloni bakteri yang sedang, +2 berarti terdapat pertumbuhan koloni bakteri yang tipis, dan +1 berarti terdapat pertumbuhan koloni bakteri yang sangat tipis. 0 berarti tidak ada pertumbuhan koloni bakteri.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Turi Merah

Alat : oven, blender, *freezer*, kertas saring, gelas ekstraksi, seperangkat evaporator vakum, alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotatory evaporator*, tabung pendingin, pompa sirkulasi air dingin, bak penampung air dingin, pompa vakum, tabung penampung etanol, batu didih, cawan

penguap, neraca analitik, tabung *erlenmeyer* ukuran 1 liter, dan botol steril untuk menampung hasil ekstrak.

Bahan : daun turi merah segar, etanol 96%, dan akuades.

4.7.2 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Alat : bunsen, korek api, ose, gelas objek, gelas penutup, spidol permanen, kertas penghisap, mikroskop.

Bahan : biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, NAP, akuades steril, pewarnaan Gram (Kristal violet, Lugol, alkohol 96%, Safranin), minyak emersi, H₂O₂ 3%, dan plasma darah.

4.7.3 Uji Dilusi Agar (*Agar Dilution Test*)

Alat : 6 *plate* kosong dan steril, mikropipet steril ukuran 10 µl, inkubator, ose, tabung reaksi, mesin *vortex*, bunsen, korek api, dan penggaris.

Bahan : ekstrak etanol daun turi merah, akuades, larutan NAP, dan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁶ CFU/ml.

4.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian mencakup pembuatan ekstrak etanol daun turi merah, identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*, dan uji kepekaan antibakteri dengan metode dilusi agar (*Agar Dilution Test*).

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Turi Merah

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun turi merah (*Sesbania grandiflora* L. Pers). Ekstrak etanol daun turi merah dibuat dengan metode maserasi, menggunakan pelarut etanol 96%. Terdapat beberapa tahap dalam pembuatan ekstrak etanol daun turi merah antara lain:

4.8.1.1 Tahap Pengeringan

- 1) Mencuci bersih daun turi merah segar yang akan dikeringkan.
- 2) Mengeringkan daun turi merah hingga bebas dari kandungan air. Apabila belum kering sempurna dapat dioven pada suhu 35°C selama 1 hari.
- 3) Menggiling dan menghaluskan daun turi merah yang sudah kering sampai terbentuk simplisia kering.

4.8.1.2 Tahap Ekstraksi

- 1) Menimbang simplisia kering sebanyak 500 gram, kemudian dimasukkan ke dalam tabung *erlenmeyer* ukuran 1 liter.
- 2) Merendam simplisia kering dalam larutan etanol 96% dengan volume 900 ml, kemudian dikocok selama ± 30 menit atau sampai benar-benar tercampur.
- 3) Mendinginkan selama 12-24 jam sampai mengendap.
- 4) Tahap diulang sampai cairan terlihat bening.

4.8.1.3 Tahap Evaporasi

- 1) Mengambil cairan bagian atas pada campuran etanol 96% dengan zat aktif yang telah larut, kemudian dimasukkan dalam labu evaporasi.
- 2) Memasang labu evaporasi pada evaporator
- 3) Menuangkan air pada *water bath* sampai penuh
- 4) Memasang semua rangkaian alat, termasuk *rotator evaporator*, pemanas *water birth* (diatur sampai 90°C, sesuai titik didih etanol sebesar 78,5°C) telah dipasang dan disambungkan dengan aliran listrik.
- 5) Membiarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada pada labu.
- 6) Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung.

- 7) Hasil evaporasi diambil dan ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven selama 2 jam pada suhu 80°C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstrak 100%.
- 8) Masukkan hasil ekstraksi ke dalam botol plastik dan disimpan di dalam freezer.

(Singh, 2008).

4.8.2 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Sebelum dilakukan uji konfirmasi, dilakukan pemurnian bakteri dengan melakukan penanaman bakteri yang diduga *Staphylococcus aureus* pada media NAP dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Uji konfirmasi yang dilakukan yaitu:

4.8.2.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram sering dilakukan untuk mengetahui sifat gram, kemurnian dan mengamati morfologi sel bakteri *Staphylococcus aureus*.

Prosedur Pewarnaan Gram menurut Dzen *dkk.* (2010) yaitu:

1. Membersihkan gelas objek dan sterilkan dengan memanaskan di atas nyala api spiritus.
2. Membuat sediaan apusan bakteri pada gelas objek.
3. Meneteskan Kristal violet hingga menutupi permukaan bakteri, dan mendiamkan selama 1 menit. Kristal violet berfungsi sebagai bahan warna dasar. Membilas pewarna kristal violet dengan air.
4. Menuangi sediaan dengan Lugol selama 1 menit kemudian membuang sisa Lugol dan membilas dengan air.

5. Menuangi sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur kemudian membuang sisa alkohol dan membilas dengan air.
6. Menuangi sediaan dengan Safranin selama 30 detik kemudian membuang sisa Safranin dan membilas dengan air. Safranin berfungsi sebagai warna pembanding.
7. Mengeringkan sediaan menggunakan kertas penghisap.
8. Dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x.

Hasil : apabila sel bakteri terwarnai keunguan maka dikelompokkan sebagai Gram positif, dan disebut Gram negatif apabila sel bakteri terwarnai merah.

4.8.2.2 Uji Katalase

Tujuan dilakukannya uji tersebut adalah untuk membedakan *Staphylococcus sp.* dengan *Streptococcus sp.* Uji katalase dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Membersihkan gelas objek dan sterilkan dengan memanaskan di atas nyala api spiritus.
2. Menetesi gelas objek dengan akuades.
3. Mencampurkan bakteri *Staphylococcus aureus* ke dalam akuades.
4. Menetesi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan H₂O₂ 3% sebanyak 1 tetes.

Hasil : katalase positif apabila ditandai dengan adanya gelembung udara setelah ditetesi yang diproduksi oleh genus *Staphylococcus* (Todar, 2008; Brooks, 2010).

4.8.2.3 Uji Koagulase

Uji koagulase digunakan untuk mengetahui adanya koagulase bebas (ada tidaknya enzim koagulase yang dihasilkan oleh *Staphylococcus sp.*). Teknik untuk melakukan tes koagulase yaitu menggunakan gelas objek:

1. Membersihkan gelas objek dan sterilkan dengan memanaskan di atas nyala api spiritus.
2. Menetesi gelas objek dengan akuades.
3. Mencampurkan bakteri *Staphylococcus aureus* ke dalam tetesan akuades.
4. Menetesi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan plasma darah sebanyak 1 tetes.

Hasil : koagulase positif ditunjukkan dengan terbentuknya gumpalan pada gelas objek, sedangkan koagulase negatif (CNS) apabila tidak terjadi penggumpalan (Brooks, 2010).

4.8.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus* (10^6 CFU/ml)

Koloni bakteri dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi *Nutrient Broth* dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Untuk mengetahui kepadatan bakteri atau *Optical Density* (OD) dari suspensi, dilakukan pemeriksaan *spektrofometri* dengan panjang gelombang 625 nm.

Setelah itu dilakukan pembuatan isolat bakteri yang disesuaikan dengan Standar *Mc Farland* 0,5 dan dilakukan pengenceran sebanyak 2 kali untuk memperoleh konsentrasi 1×10^6 dengan cara:

1. Diambil 1 ml dari 10 ml larutan bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml dan dimasukkan kedalam tabung yang telah diisi 9 ml *Nutrient Broth* sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^7 CFU/ml
2. Diambil 1 ml dari larutan dengan konsentrasi bakteri 10^7 CFU/ml tersebut dan dimasukkan kedalam tabung yang telah diisi 9 ml *Nutrient Broth* sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/ml

Konsentrasi bakteri 10^6 CFU/ml tersebut yang digunakan dalam penelitian.

4.8.4 Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Turi Merah terhadap *Staphylococcus aureus* secara *In vitro*

Uji dilusi agar dilakukan untuk menentukan KHM yang tidak dapat diketahui menggunakan metode dilusi tabung. Hal ini disebabkan ekstrak etanol daun turi merah (*Sesbania grandiflora* L. Pers) berwarna keruh dan menggumpal sehingga mengganggu visualisasi untuk menentukan KHM.

Prosedur uji dilusi agar adalah sebagai berikut.

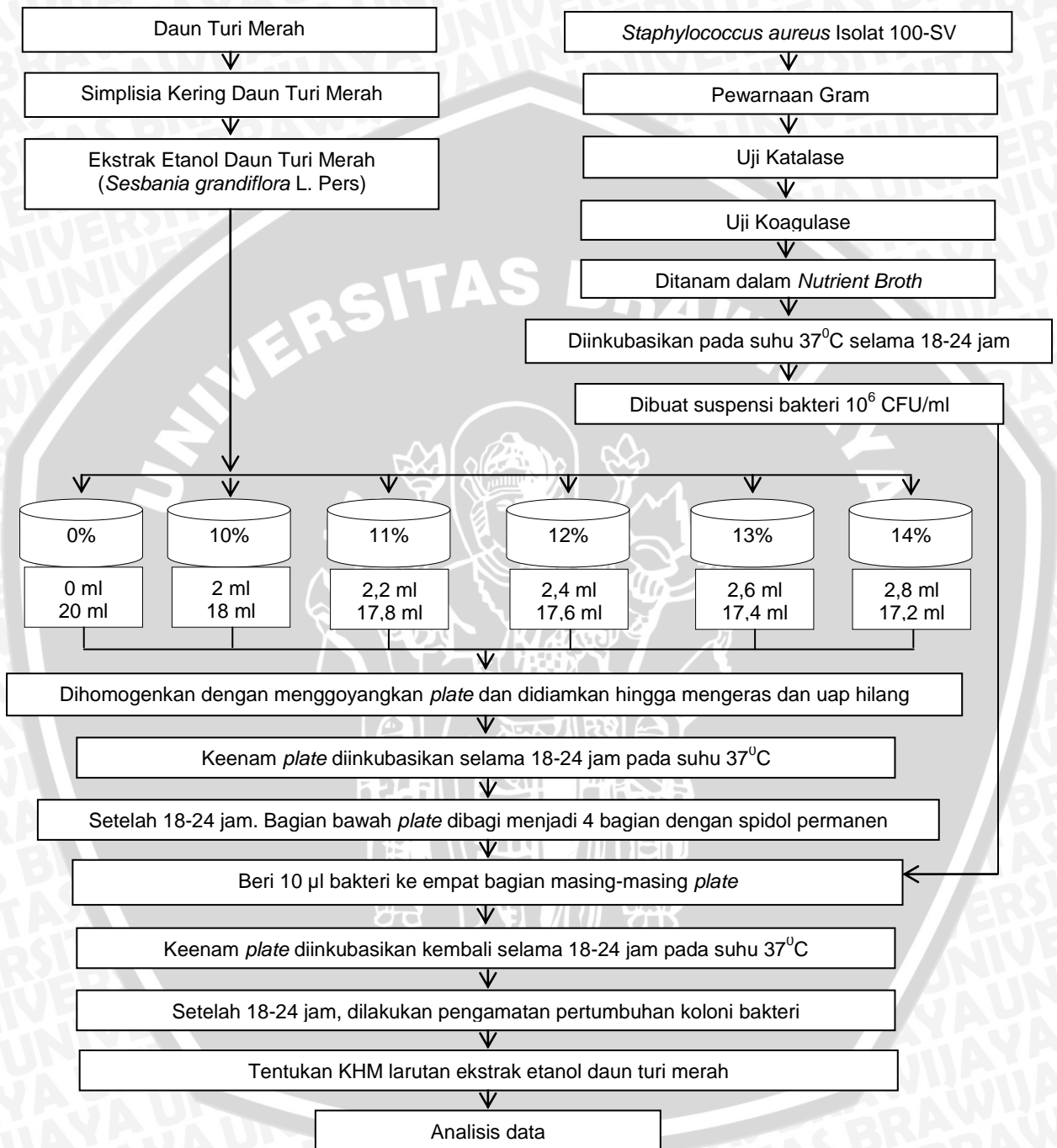
1. Disediakan 6 *plate* steril berdiameter 9 cm dan masing-masing *plate* telah diberi tanda berdasarkan konsentrasi ekstrak, yaitu 0%, 10%, 11%, 12%, 13%, dan 14%. Setiap *plate* akan diisi dengan campuran antara ekstrak dengan agar dimana volume total dalam tiap *plate* adalah 20 ml.
2. Dimasukkan ekstrak etanol daun turi merah sesuai dengan konsentrasinya kemudian ditambahkan agar berupa larutan NAP. Perbandingan volume ekstrak etanol daun turi merah dengan volume agar pada tiap *plate* adalah sebagai berikut.

Tabel 4.1 Perbandingan Volume Ekstrak Etanol Daun Turi Merah dengan Volume Agar dalam Satu *Plate* Sesuai dengan Konsentrasinya

Konsentrasi Ekstrak	Volume Ekstrak	Volume Agar	Total Volume dalam Satu <i>Plate</i>
0%	0 ml	20 ml	20 ml
10%	2 ml	18 ml	20 ml
11%	2,2 ml	17,8 ml	20 ml
12%	2,4 ml	17,6 ml	20 ml
13%	2,6 ml	17,4 ml	20 ml
14%	2,8 ml	17,2 ml	20 ml

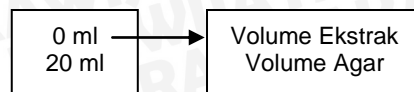
- Setelah itu dihomogenkan dengan cara menggoyangkan *plate*. Apabila telah tercampur secara merata, didiamkan sampai mengeras dan diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- Bakteri uji yang dipakai adalah bakteri yang diencerkan sampai 10⁶ CFU/ml.
- Setelah 18-24 jam, bagian bawah dari setiap *plate* tersebut ditandai menjadi 4 bagian dengan menggunakan spidol permanen. Kemudian dilakukan penetesan bakteri uji sebanyak 10⁶ bakteri/10µl pada keempat bagian tersebut dan diinkubasi kembali selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- Setelah 18-24 jam, dilihat koloni yang tumbuh pada *plate*. Konsentrasi ekstrak terendah pada *plate* yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni disebut sebagai Kadar Hambat Minimal (KHM).

4.8.5 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Kerja Penelitian

Keterangan : KHM = Kadar Hambat Minimal



4.9 Analisis Data

Pada penelitian ini, KHM diperoleh secara kualitatif dimana data mengenai pertumbuhan koloni bakteri berdasarkan konsentrasi ekstrak etanol daun turi merah (*Sesbania grandiflora* L. Pers) dilihat dari pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada media NAP. Data tersebut dianalisis secara statistik pada taraf kepercayaan 99% ($\alpha=0,01$). Uji statistik yang digunakan adalah uji statistik non-parametrik yang terdiri dari uji Kruskal Wallis, uji Mann Whitney, dan uji korelasi Spearman.

Uji Kruskal Wallis digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun turi merah terhadap pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Analisis setelah uji Kruskal Wallis adalah dilakukan Uji Mann Whitney. Fungsi uji Mann Whitney adalah untuk mencari kelompok mana yang berbeda signifikan. Selain itu, uji ini juga digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan respon dari dua populasi data yang saling independen. Tes ini merupakan tes paling kuat diantara tes-tes nonparametrik.

Selanjutnya, uji korelasi dilakukan untuk mengetahui kekuatan dan keeratan hubungan antara variabel dependen dan variabel independen yaitu antara ekstrak etanol daun turi merah terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Uji korelasi yang digunakan pada statistik non-parametrik adalah uji korelasi Spearman. Selain untuk mengetahui kekuatan dan keeratan hubungan, uji korelasi Spearman juga dapat digunakan untuk mengetahui koefisien korelasi dan arah korelasinya.