

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

## 4.1 Desain dan Rancangan Operasional Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah desain penelitian eksperimental laboratoris untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dengan berbagai konsentrasi terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Penelitian ini akan menggunakan metode dilusi agar yang kemudian melalui metode ini dapat ditentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dari bahan antimikroba. Pada penelitian ini ditemukan 2 kelompok, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan, yaitu kelompok bakteri yang diberi ekstrak daun kemangi. Sedangkan untuk kelompok kontrol, yaitu kelompok bakteri yang tidak diberi ekstrak daun kemangi.

Adapun rancangan operasional penelitian ini, yaitu sebagai berikut: ekstrak daun kemangi dicampurkan pada sejumlah volume agar hingga didapatkan beberapa konsentrasi. Kemudian inkubasikan setiap plate pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah dipastikan bahwa tidak ada kontaminasi pertumbuhan bakteri lain, teteskan suspensi kuman *Klebsiella pneumoniae* dengan menggunakan mikropipet (1 tetes mikro pipet setara dengan 10 $\mu$ l suspensi bakteri yang mengandung 10<sup>4</sup> CFU). Setelah diinkubasikan kembali selama 24 jam, amati pertumbuhan bakteri pada setiap plate, bandingkan dengan kontrol, dan lakukan skoring. Konsentrasi ekstrak terendah dimana tidak didapatkan pertumbuhan koloni bakteri adalah plate dengan konsentrasi yang

dapat disebut sebagai kadar hambat minimum (KHM).

#### 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Maret hingga Juli 2015.

#### 4.3 Sampel Penelitian

Populasi objek penelitian adalah seluruh bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Sedangkan yang menjadi sampel adalah bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Saiful Anwar dari sputum penderita pneumonia yang telah diuji biokimia dan memberikan hasil sesuai karakteristik bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Pada penelitian ini, digunakan 7 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda, serta 1 kontrol positif, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus estimasi pengulangan sbb (Loekito, 1998):

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 \rightarrow 3$$

keterangan: n= jumlah pengulangan

p= jumlah perlakuan (konsentrasi ekstrak daun kemangi)

Jadi, dari hasil perhitungan diatas, maka diperlukan 3 kali pengulangan untuk sampel, yaitu dengan sediaan 3 sputum dari individu berbeda.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi yang berbeda-beda.

##### 4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Pengukuran variabel tergantung yaitu dengan melihat pertumbuhan koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

#### 4.5 Definisi Operasional

1. Daun kemangi yang digunakan adalah sediaan yang dibeli di Pasar Belimbing kota Malang, yang kemudian diekstrak di Materia Medika Batu dengan pelarut etanol 96% melalui proses maserasi dan evaporasi.
2. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* adalah bakteri yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Saiful Anwar dari sputum penderita pneumonia yang telah diuji biokimia dan memberikan hasil sesuai karakteristik bakteri *Klebsiella pneumoniae*.
3. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal larutan ekstrak daun kemangi yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Hal ini ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri pada ekstrak dengan konsentrasi terendah.
4. Kontrol positif / Kontrol bakteri adalah konsentrasi 0% (tanpa ekstrak) yang dapat digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri lain. Kontrol positif berasal dari larutan

bakteri uji yang telah distandarisasi dengan standar spektrofotometri.

#### 4.6 Instrumen Penelitian

##### 4.6.1 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

Alat yang digunakan untuk identifikasi bakteri *Klebsiella pneumoniae* antara lain ose lurus, ose lengkung, kertas penghisap, minyak emersi, mikroskop, tabung reaksi, lampu spiritus, dan *oksidase detector strips*. Sedangkan bahan yang digunakan antara lain isolat *Klebsiella pneumoniae*, pewarnaan gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), *nutrient broth*, medium *Mac Conkey Agar*, TSI agar, bahan tes IMViC-MU, dan *Microbact Kit*.

##### 4.6.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Kemangi

Dalam pembuatan ekstrak daun kemangi alat yang diperlukan antara lain oven, timbangan, gelas erlenmeyer, corong gelas, kertas saring, labu evaporator, labu penampung etanol, *rotary evaporator*, pendingin spiral, selang *water pump*, *water pump*, *water bath*, botol hasil ekstrak, *freezer* dan *vacum pump*. Sedangkan bahan yang digunakan adalah daun kemangi, etanol 96%, dan aquades.

### 4.6.3 Alat dan Bahan Uji Kepekaan Ekstrak Daun Kemangi

Dalam melakukan uji kepekaan ekstrak daun kemangi, alat-alat yang digunakan antara lain plate kosong dan steril, ose lengkung, mikropipet 1 ml dan pipet steril 10 ml, inkubator, lampu spiritus, label, dan spektrofotometri. Sedangkan bahan yang digunakan antara lain perbenihan cair *Klebsiella pneumoniae*, ekstrak daun kemangi, dan *nutrient agar*.

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Identifikasi Bakteri

#### 4.7.1.1 Pewarnaan Gram (Finegold, 1986)

Pada hari pertama, sampel *Klebsiella pneumoniae* diidentifikasi dengan pewarnaan Gram. Kemudian beberapa ose ditanam pada *selenit broth*, lalu diinkubasi semalam pada suhu 37°C.

Sebelum memulai pewarnaan, bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan bakteri kontaminan. Kemudian diamkan 1-3 detik agar gelas obyek tidak terlalu panas.

- 1) Satu ose aquades steril ditetaskan pada gelas obyek, kemudian ambil sedikit bakteri untuk disuspensikan dengan aquades yang telah diletakkan diatas gelas obyek. Kemudian biarkan kering diudara.
- 2) Suspensi bakteri yang telah kering difiksasi dengan cara melewatkannya diatas api beberapa kali dan sediaan siap diwarnai.
- 3) Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan tunggu selama satu menit. Kemudian kristal violet dibuang dan dibilas dengan air perlahan-lahan.

- 4) Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama satu menit, lalu lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- 5) Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% dan ditunggu selama 5-10 detik, kemudian alkohol 96% segera dibuang dan dibilas dengan air.
- 6) Sediaan ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama 30 detik kemudian safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- 7) Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat dibawah mikroskop.

#### 4.7.1.2 Tes oksidase

- 1) Potongan *oksidase detector strips* diletakkan pada cawan petri
- 2) Koloni bakteri yang terpisah dari medium digoreskan pada paper strip tersebut, kemudian dilihat reaksinya. Tes dikatakan positif apabila warna goresan tersebut menjadi ungu sampai hitam dalam waktu  $\frac{1}{2}$  - 1 menit. Akan didapatkan hasil oksidase negatif pada bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

#### 4.7.1.3 Tes Microbact

Untuk melakukan identifikasi bakteri *K. pneumoniae*, maka dilakukan tes *microbact*. Tes ini merupakan sistem sederhana yang terstandarisasi untuk identifikasi bakteri secara cepat. *Microbact Kit* mencakup miniatur tes biokimia 12 (12A, 12B dan 12E) atau 24 (24E). Identifikasi bakteri didasarkan pada perubahan PH dan penggunaan substrat. Tes *microbact* untuk bakteri Gram negatif dengan hasil tes oksidase negatif digunakan set 12A (dengan strip) atau 12E (dengan

*microplate*). Bakteri Gram negatif dengan hasil tes oksidase positif menggunakan set 12B yang dilengkapi dengan set 12A. Kemudian setelah melakukan prosedur tes *microbact*, hasil dari tes dapat diinterpretasikan menggunakan program tertentu yang telah disertakan dalam paket *microbact* (Oxoid, 2013).

#### 4.7.2 Pembentukan Perbenihan Cair Bakteri (Bailey et al., 1994)

Setelah dipastikan bakteri adalah batang Gram negatif, dengan tes oksidase negatif, fermentasi laktosa positif (merah), tes indol negatif, tes *voges-proskauer* positif, tes *citrate* positif dan motilitas negatif, maka selanjutnya bakteri *K. pneumoniae* dipindahkan dalam tabung yang berisi *nutrient broth* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Kemudian dilakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui *optical density* dari suspensi. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10<sup>8</sup> CFU/ml yang setara dengan OD=0,1, dilakukan perhitungan sebagai berikut:

$$n_1 \times V_1 = n_2 \times V_2$$

Keterangan:

V<sub>1</sub>: Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

n<sub>1</sub>: Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V<sub>2</sub>: Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

n<sub>2</sub>: OD (0,1 setara dengan 10<sup>8</sup> CFU/ml)

Kemudian setelah diperoleh V<sub>1</sub>, kepadatan bakteri tersebut akan diencerkan 2x dengan menggunakan NaCl dan *nutrient broth* menjadi 10<sup>6</sup> CFU/ml. Dengan contoh sebagai berikut, apabila diperoleh OD bakteri hasil

spektrofotometri = 0,404 ( $n_1$ ), OD bakteri dengan kepadatan  $10^8$  CFU/ml = 0,1 ( $n_2$ ), dan volume keseluruhan dalam 1 tabung = 10 ml ( $V_2$ ), maka:

$$n_1 \times V_1 = n_2 \times V_2$$

$$0,404 \times V_1 = 0,1 \times 10$$

$$V_1 = 1/0,404$$

$$V_1 = 2,47 \approx 2,5 \text{ ml}$$

Suspensi bakteri sebanyak 2,5 ml ditambah dengan NaCl 7,5 ml → menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan  $10^7$  CFU/ml. Selanjutnya dari suspensi bakteri tersebut diambil 1 ml kembali, kemudian dicampur dengan *nutrient broth* 9 ml, tujuannya agar bakteri mendapatkan nutrisi dari *nutrient broth* tersebut → menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan  $10^6$  CFU/ml. Suspensi bakteri dengan kepadatan  $10^6$  CFU/ml ini siap digunakan untuk uji sensitivitas mikroba dengan metode dilusi agar.

#### 4.7.3 Pembuatan Ekstrak Daun Kemangi

1. Proses pengeringan
  - a. Cuci bersih daun kemangi (sampel basah) yang akan dikeringkan.
  - b. Potong kecil-kecil.
  - c. Lalu oven dengan suhu  $80^\circ\text{C}$  atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air).
2. Proses ekstraksi
  - a. Setelah kering, haluskan dengan blender sampai halus.
  - b. Timbang serbuk daun kemangi sebanyak 200 g (sampel kering).
  - c. Lakukan pembasahan serbuk dengan pelarut etanol 96% sebanyak 200 ml.

- d. Masukkan serbuk daun kemangi yang telah dibasahi dengan pelarut ke dalam toples, diratakan dan sambil ditambahkan pelarut etanol 96% sampai serbuk terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat serbuk atau lebih, jadi total yang digunakan 800 ml).
  - e. Tutup toples dengan rapat selama 24 jam, dan aduk dalam shaker digital dengan rpm 50.
  - f. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam Erlenmeyer
  - g. Ampas dimasukkan lagi dalam toples dan tambahkan pelarut sampai terendam (minimal pelarut 5 cm di atas permukaan serbuk), dalam hal ini digunakan 800 ml.
  - h. Biarkan semalam atau 24 jam dan dishaker.
  - i. Remaserasi dilakukan sampai filtrat/ ekstrak lebih jernih (dalam hal ini diulang hingga 2 kali)
3. Proses evaporasi
- a. Ambil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir yang telah disaring, kemudian dijadikan satu.
  - b. Masukkan ke dalam labu evaporasi.
  - c. Pasang labu evaporasi pada rotary evaporator.
  - d. Isi *water bath* dengan air sampai penuh.
  - e. Pasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary* evaporator, pemanas *water bath* (atur sampai 90°C). Sambungkan dengan aliran listrik.
  - f. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.

- g. Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ( $\pm 1,5$  sampai 2 jam untuk 1 labu).
- h. Hasil yang diperoleh kira-kira 1/3 dari bahan alam yang kering
- i. Masukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik.
- j. Simpan dalam *freezer*.

#### 4.7.4 Eksplorasi Penelitian

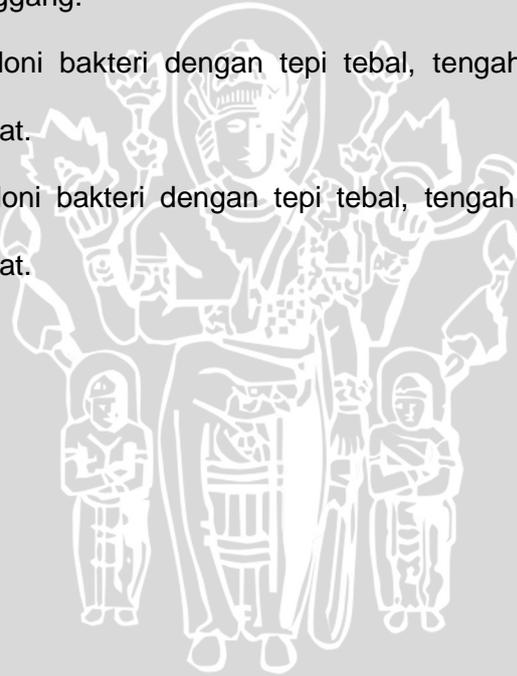
Untuk menentukan konsentrasi ekstrak yang akan dipakai penelitian yang sebenarnya, terlebih dahulu dilakukan serangkaian uji sensitivitas bakteri *K. pneumoniae* terhadap ekstrak daun kemangi secara *in vitro* dengan metode yang sama yaitu metode dilusi agar. Adapun konsentrasi ekstrak yang dipakai adalah 0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16% v/v. Dari eksplorasi tersebut didapatkan KHM di konsentrasi 14%. Selanjutnya dilakukan penentuan dosis yang akan digunakan sebagai data dengan konsentrasi sebagai berikut 0%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14% dan 16% v/v.

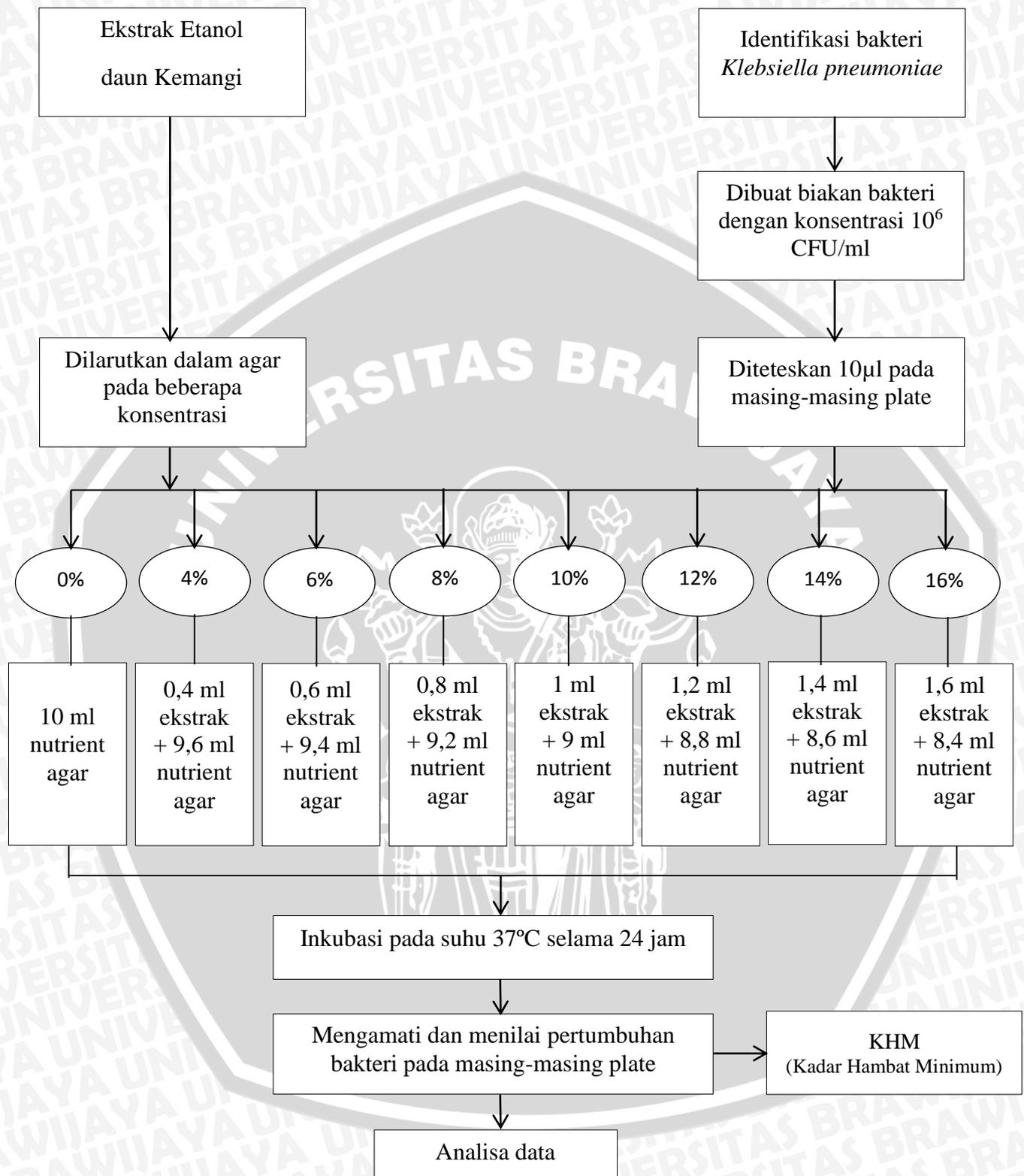
#### 4.7.5 Uji Kepekaan Ekstrak Daun Kemangi Terhadap *Klebsiella pneumoniae*

- 1) Menyediakan 8 plate berdiameter 9 cm yang sebelumnya telah disterilisasi dengan menggunakan autoklaf (suhu 121°C selama 15 menit).
- 2) Masing-masing plate diisi dengan larutan ekstrak etanol daun kemangi dengan konsentrasi 0%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16% yang dicampur dengan nutrient agar. Volume nutrient agar yang dipakai dalam setiap plate adalah 10 ml dengan rincian sebagai berikut:

- a) Konsentrasi 0% : tanpa ekstrak daun kemangi + 10 ml nutrient agar.
  - b) Konsentrasi 4% : 0,4 ml ekstrak daun kemangi + 9,6 ml nutrient agar.
  - c) Konsentrasi 6% : 0,6 ml ekstrak daun kemangi + 9,4 ml nutrient agar.
  - d) Konsentrasi 8% : 0,8 ml ekstrak daun kemangi + 9,2 ml nutrient agar.
  - e) Konsentrasi 10% : 1 ml ekstrak daun kemangi + 9 ml nutrient agar.
  - f) Konsentrasi 12% : 1,2 ml ekstrak daun kemangi + 8,8 ml nutrient agar.
  - g) Konsentrasi 14% : 1,4 ml ekstrak daun kemangi + 8,6 ml nutrient agar.
  - h) Konsentrasi 16% : 1,6 ml ekstrak daun kemangi + 8,4 ml nutrient agar.
- 3) Menginkubasikan agar dengan suhu 37°C selama 24 jam.
  - 4) Setelah melakukan pengecekan dan yakin bahwa tidak terdapat kontaminasi (pertumbuhan) bakteri lain, maka kemudian setiap plate dibagi 4 bagian untuk masing-masing isolat (kepentingan pengulangan) yang kemudian masing-masing bagian akan ditetesi bakteri uji sebanyak 10µl (10<sup>4</sup> CFU/ tetes). Lalu inkubasikan masing-masing plate dengan suhu 37°C selama 24 jam.
  - 5) Koloni yang tumbuh pada agar plate diamati. Plate dengan konsentrasi ekstrak terendah dimana tidak ditemukan pertumbuhan koloni bakteri adalah plate dengan konsentrasi yang dapat disebut sebagai kadar hambat minimum (KHM).

- 6) Hasil penelitian dinyatakan dalam bentuk skoring, yaitu 5,4,3,2,1 dan 0 yang berarti:
- a) 0 adalah tidak didapatkan pertumbuhan koloni bakteri.
  - b) 1 adalah koloni bakteri dengan tepi tidak terlihat, tengah sangat tipis, dan koloni tersusun sangat renggang.
  - c) 2 adalah koloni bakteri dengan tepi tipis, tengah tipis, dan koloni tersusun renggang.
  - d) 3 adalah koloni bakteri dengan tepi tebal, tengah tipis, dan koloni tersusun renggang.
  - e) 4 adalah koloni bakteri dengan tepi tebal, tengah tipis, dan koloni tersusun padat.
  - f) 5 adalah koloni bakteri dengan tepi tebal, tengah tebal, dan koloni tersusun padat.





Gambar 4.1 Skema Uji Antimikroba Ekstrak Daun Kemangi terhadap *Klebsiella pneumoniae*

#### 4.8 Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data ordinal (kategorik) dari hasil skoring koloni *Klebsiella pneumoniae* pada NAP yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Analisis yang digunakan adalah uji hipotesis komparatif dan korelatif. Uji komperatif bertujuan untuk mengetahui apakah perbedaan konsentrasi ekstrak daun kemangi mempunyai pengaruh terhadap pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae*. Sedangkan, uji korelatif bertujuan untuk melihat apakah ada hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak daun kemangi dengan pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae*. Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak, dan variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan koloni bakteri. Karena kelompok pada penelitian ini tidak berpasangan, maka uji hipotesis komparatif yang digunakan adalah uji non parametrik Kruskal Wallis dan Mann Whitney. Sedangkan uji korelatif yang digunakan adalah uji Spearman. Analisis statistik tersebut dilaksanakan dengan derajat kepercayaan 95%,  $\alpha=0,05$  (bermakna bila  $p<0,05$ )