

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental dengan desain *post test control group*. Uji antibakteri menggunakan metode dilusi agar untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus*) yang dapat mempengaruhi isolat bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*. Metode dilusi agar dipakai untuk menentukan nilai KHM.

4.2 Estimasi Sampel Penelitian

Pada penelitian ini digunakan sampel berupa bakteri *Escherichia coli* dengan kepadatan 10^6 CFU/mL yang dikultur di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

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

$$p(n-1) = 15$$

Keterangan:

p = Jumlah perlakuan (terdiri dari enam macam perlakuan/konsentrasi)
n = Jumlah sampel

Penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi dari ekstrak etanol daun katuk dan 1 kontrol *Escherichia coli* tanpa diberi ekstrak etanol daun katuk ($p=5+1=6$) maka didapatkan jumlah pengulangan:

$$6(n-1) = 15$$

$$6n-6 = 15$$

$$6n = 21$$

n 3,5 3

Dengan demikian, untuk memenuhi persyaratan uji statistik diperlukan 3 sampel penelitian.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel tergantung.

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus*) yang dibuat dalam berbagai konsentrasi tertentu. Penentuan konsentrasi berdasarkan penelitian pendahuluan (9,2%; 9,4%; 9,6%; 9,8%; dan 10%).

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

4.4 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang yang dilakukan Maret 2015 s.d Juni 2015. Bahan daun katuk (*Sauropus androgynous*) diperoleh di Materia Medika Kota Batu. Tempat ekstraksi di Polinema Negeri Malang.

4.5 Definisi Operasional

- a. Daun katuk (*Sauropus androgynous*) yang digunakan adalah daun katuk tua yang berwarna hijau tua yang didapatkan dari Balai Materia Medika, Batu, Malang.
- b. Ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynous*) didapat dengan mengeringkan daun katuk tua, kemudian dihaluskan, setelah itu dilakukan ekstraksi dingin (maserasi) dengan menggunakan etanol 96%.
- c. Konsentrasi ekstrak daun katuk yang digunakan pada penelitian ini (9,2%; 9,4%; 9,6%; 9,8%; dan 10%) diperoleh berdasarkan eksplorasi penelitian sebelumnya.
- d. Isolat bakteri *Escherichia coli* didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- e. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi ekstrak etanol daun katuk terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *Escherichia coli*, ditandai dengan tidak ada pertumbuhan koloni pada médium agar.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

Alat yang digunakan untuk identifikasi dan tes kepekaan bakteri *Escherichia coli* adalah alat *Microbact* 12A/E atau 24E , cawan petri, ose, tabung reaksi, inkubator, gelas obyek, korek api, spidol permanen, pipet steril 10 mL,

mikroskop, penggaris, labu Erlenmeyer, bunsen, minyak emersi, alat inkubasi, spektrofometri, dan kertas penghisap.

Alat pembuatan ekstrak etanol daun katuk yaitu timbangan analitik, pisau, oven, blender, *rotary evaporator vaccum*, gelas ukur 10 mL, erlenmeyer 500 mL, erlenmeyer 1 L, *beaker glass*, tabung reaksi, mikro pipet, vortex, pengaduk kaca, kertas saring/whatman, gelas ekstraksi dan sentrifus set.

4.6.2 Bahan

Bahan untuk identifikasi *Escherichia coli* yaitu biakan murni *Escherichia coli* dengan kepadatan 10^8 bakteri/cc, aquadest, bahan pewarna Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), dan bahan identifikasi *Microbact* 12A/E atau 24E

Bahan untuk pembuatan ekstrak etanol daun katuk yaitu daun katuk (200 gram sediaan kering), etanol 96% dan *aquadest* steril. Bahan uji kepekaan ekstrak etanol daun katuk terdiri dari satu isolate *Escherichia coli*, ekstrak etanol daun katuk, *Nutrient Broth*, NAP, NaCl, dan aquadest steril.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Katuk

Pembuatan ekstrak daun katuk dimulai dengan persiapan sampel daun katuk, dilanjutkan pembuatan sediaan ekstrak daun katuk yang terdiri atas proses maserasi dan evaporasi.

4.7.1.1 Persiapan sampel daun katuk

Daun katuk tua dipotong kecil-kecil dan dikeringkan kemudian dihaluskan dengan blender dan timbang sebanyak 200 gram (sampel kering).

4.7.1.2 Maserasi

Pertama, Daun katuk yang sudah dalam bentuk serbuk ditimbang (200 gram). Sampel kering tersebut dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter. Sampel tersebut kemudian direndam dengan etanol 96% hingga volumenya 600 ml. Setelah itu, sampel dikocok hingga benar-benar tercampur (\pm 30 menit). Sampel tersebut kemudian dibiarkan selama 1 malam sampai mengendap. Setelah dilakukan maserasi, dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring *whatman*. Proses maserasi ini dilakukan sampai hasil ekstraksi jernih. Kemudian hasil maserasi siap untuk dievaporasi.

4.7.1.3 Evaporasi

Lapisan atau campuran etanol dengan zat aktif daun katuk yang sudah terlarut diambil lalu dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter. Labu evaporasi dipasang pada evaporator. Water bath diisi dengan air sampai penuh. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk rotary evaporator, pemanas water bath diatur sampai suhu 80°C, di atas titik didih etanol 78°C (Buckley, 2006), lalu disambungkan dengan aliran listrik. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada di dalam labu. Aliran etanol ditunggu sampai berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu). Hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol plastik dan dimasukkan ke dalam *freezer*. Hasil evaporasi berupa cairan kental. Dalam penelitian ini hasil evaporasi dianggap konsentrasi 100%.

4.7.2 Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*

Isolat bakteri yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi selanjutnya diidentifikasi ulang, meliputi pewarnaan Gram dan uji biokimia.

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Gelas obyek dibersihkan dengan kapas dan dilewatkan di atas api untuk dihilangkan lemaknya dan kemudian dibiarkan dingin. Sediaan bakteri dioleskan di atas gelas obyek dengan ketebalan yang cukup (tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis) dan dibiarkan kering di udara dan kemudian difiksasi di atas lampu Bunsen. Sediaan dituangi dengan Kristal Violet selama 1 menit lalu dibilas dengan air. Kemudian sediaan dituangi dengan Lugol selama 1 menit lalu dibilas dengan air. Setelah itu, sediaan dituangi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik lalu sediaan dibilas dengan air. Langkah selanjutnya, sediaan dituangi dengan safranin selama setengah menit lalu sediaan dibilas dengan air. Berikutnya sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, selanjutnya dilihat di bawah mikroskop dengan obyektif perbesaran 1000x (Dzen *et al*, 2010). Hasil positif bakteri *Escherichia coli* diperoleh jika didapatkan bentuk batang dan berwarna merah (bersifat Gram negatif).

4.7.2.2 Uji Biokimia

Uji biokimia dilakukan dengan menggunakan *Microbact*TM 12A *Gram-Negative Identification System*. Sistem *Microbact*TM adalah sistem mikro-substrat terstandar yang dirancang untuk menstimulasikan substrat biokimia konvensional yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri Enterobacteriaceae dan bakteri bermacam-macam bakteri Gram negatif

lainnya. Cara menggunakan sistem *Microbact*TM adalah sebagai berikut:

1. Sebelum ditentukan menggunakan 12A/12E atau 24E, koloni bakteri dilakukan uji oksidase, jika hasil oksidase negatif menggunakan sistem *Microbact*TM 12A/12E saja, sedangkan jika hasil oksidasenya positif maka menggunakan jenis 24E. Untuk bakteri *Escherichia coli* dikarenakan mempunyai hasil oksidase yang negatif, maka menggunakan sistem *Microbact*TM 12A/12E
2. Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 5 ml garam fisiologis 0,9% pada tabung reaksi steril dan divortex hingga homogen.
3. Larutan bakteri yang telah homogen diteteskan ke dalam semua sumur *Microbact*TM sebanyak 100 UI (4 tetes), untuk sumur 1 Lysin, sumur 2 Omitin, dan sumur 3 H₂S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact*TM diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
4. *Microbact*TM yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan 2 tetes reagent 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. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan table warna.

Penjelasan untuk tabel warna untuk sistem *Microbact*TM adalah sebagai berikut:

1. Sumur 1, *Lysine*, memberikan hasil negatif berwarna kuning dan hasil positif berwarna biru-hijau. Pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan hasil positif.
2. Sumur 2, *Omithine*, memberikan hasil negatif berwarna kuning kehijauan dan hasil positif berwarna biru. Pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan hasil positif.
3. Sumur 3, H_2S , memberikan hasil negatif berwarna kekuningan dan hasil positif berwarna hitam. Pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan hasil negatif.
4. Sumur 4, *Glucose*, memberikan hasil negatif berwarna biru kehijauan dan hasil positif berwarna kuning. Pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan hasil positif.
5. Sumur 5, *Mannitol*, memberikan hasil negatif berwarna biru kehijauan dan hasil positif berwarna kuning. Pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan hasil positif. Pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan hasil positif.
6. Sumur 6, *Xylose*, memberikan hasil negatif berwarna biru kehijauan dan hasil positif berwarna kuning. Pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan hasil positif.
7. Sumur 7, ONPG (*Hydrolysis of o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside*), memberikan hasil negatif tidak berwarna dan hasil positif berwarna kuning. Pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan hasil positif

8. Sumur 8, *Indol*, memberikan hasil negatif tidak berwarna dan hasil positif berwarna merah muda. Pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan hasil positif.
9. Sumur 9, *Urease*, memberikan hasil negatif berwarna kekuningan dan hasil positif berwarna merah muda. Pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan hasil negatif.
10. Sumur 10, *VP (Voges-Proskauer Reaction)*, memberikan hasil negatif berwarna kekuningan dan hasil positif berwarna merah muda. Pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan hasil negatif.
11. Sumur 11, *Citrate*, memberikan hasil negatif berwarna hijau dan hasil positif berwarna biru. Pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan hasil negatif.
12. Sumur 12, *TDA (Production of indolepyruvate by deamination of tryptophan)*, memberikan hasil negatif berwarna kekuningan dan hasil positif berwarna merah tua. Pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan hasil negatif.

4.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Koloni *Escherichia coli* yang diambil memiliki karakteristik sama dari media *Nutrient Agar Plate* dengan menggunakan ose. Koloni tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient broth*, kemudian dilakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625nm, untuk mengetahui *optical density* (OD) dari suspensi tersebut. konsentrasi bakteri sebesar $10^8/\text{mL}$ yang setara dengan OD (*Optical Density*) = 0,1 (Murray *et al*, 1999) didapatkan setelah dilakukan 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)

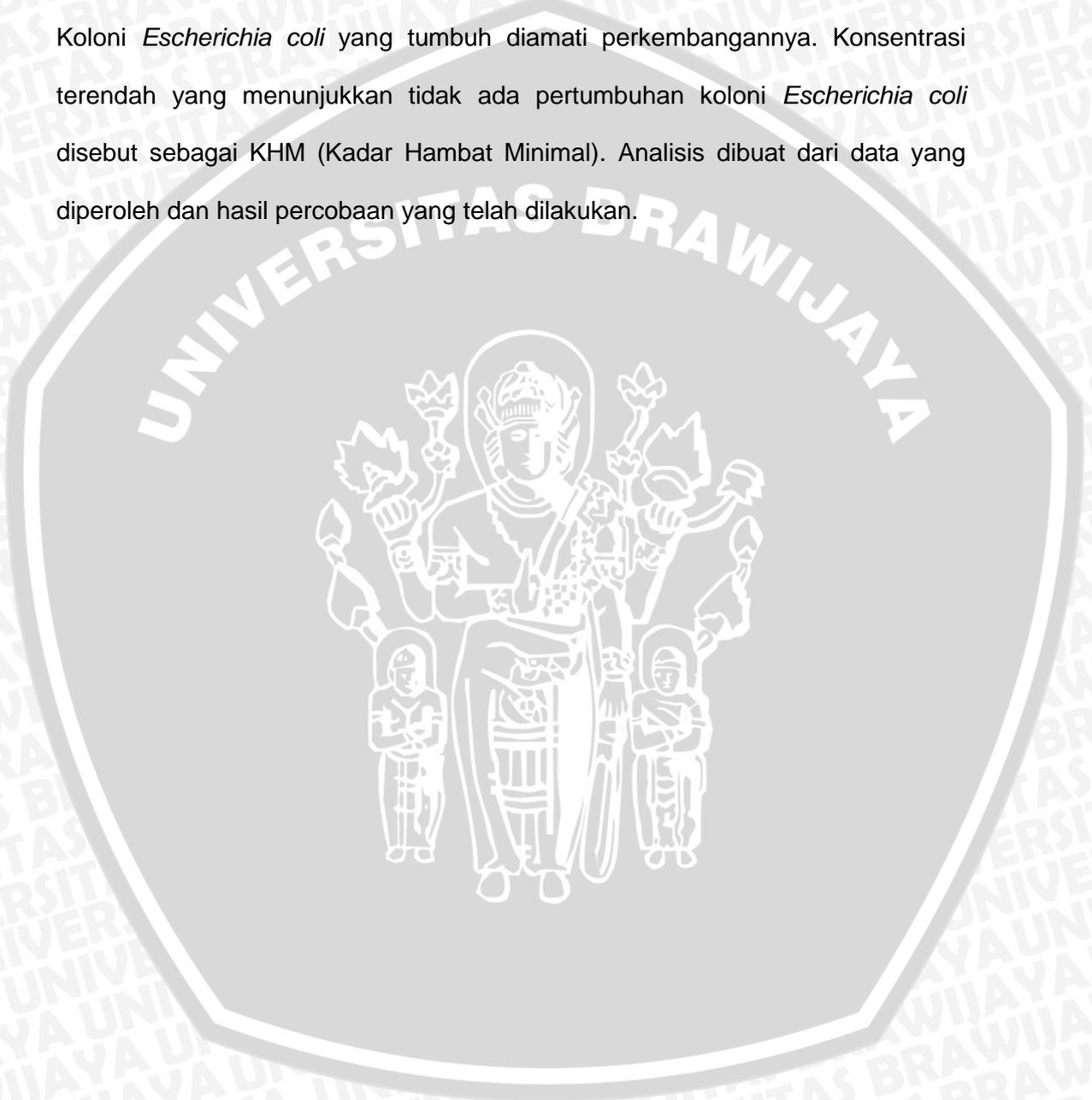
V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 mL)

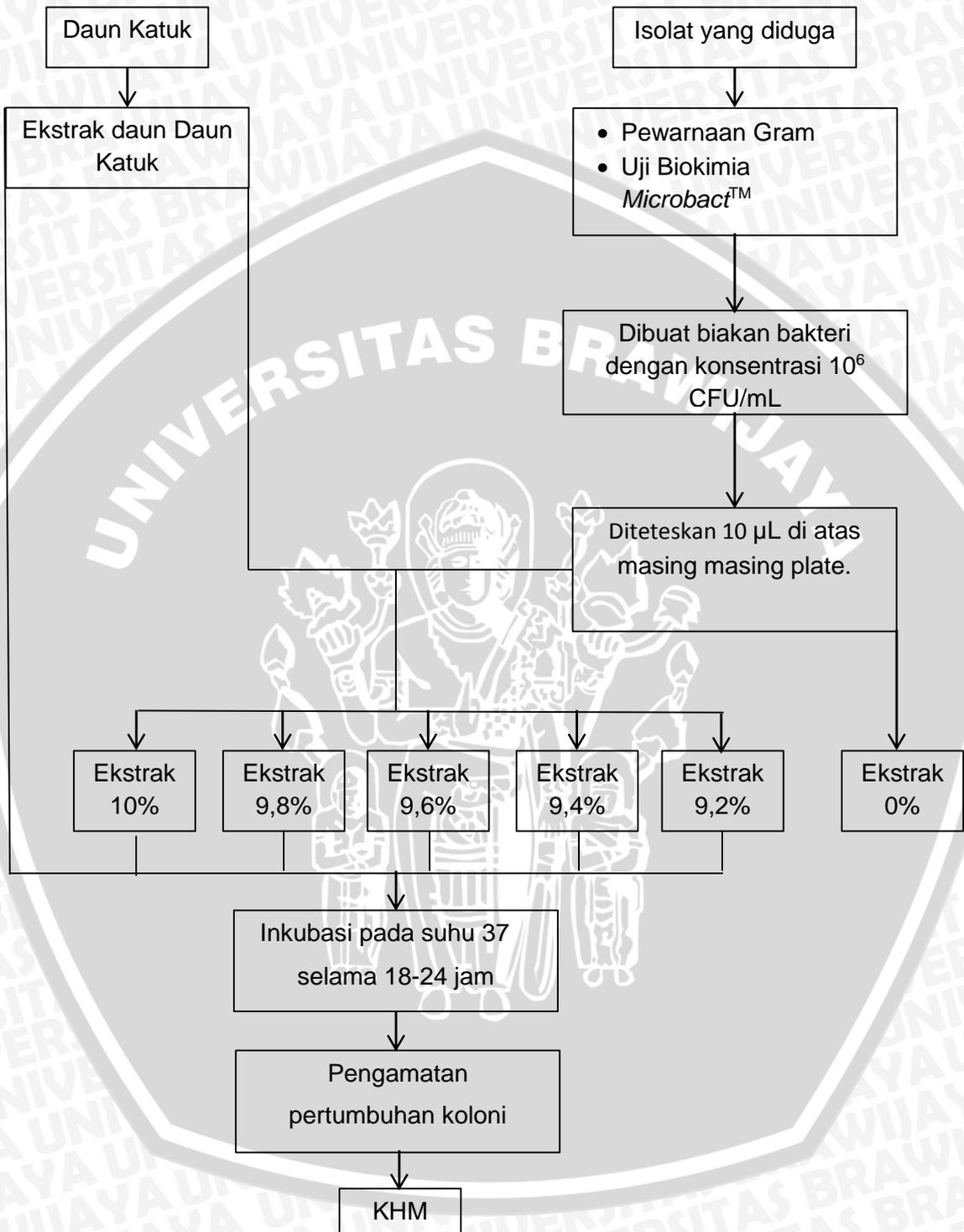
Dari rumus tersebut, diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk didapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 /mL sebanyak 10 mL. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 /mL sebanyak 10mL, dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan NaCl dan *Nutrient Broth*, sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 /mL. Kini bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

4.7.4 Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Katuk

Enam plate steril disiapkan dan diberi tanda 10%; 9,8%; 9,6%; 9,4%; dan 9,2% serta 0%. 10 mL nutrisi agar dimasukkan ke dalam *plate* bertanda 0%. 9 mL nutrisi agar dimasukkan ke dalam *plate* berlabel 10% lalu ditambahkan 1 mL ekstrak etanol daun katuk. 9,02 mL nutrisi agar dimasukkan ke dalam *plate* berlabel 9,8% lalu ditambahkan 0,98 mL ekstrak etanol daun katuk. 9,04 mL nutrisi agar dimasukkan ke dalam *plate* berlabel 9,6% lalu ditambahkan 0,96 mL ekstrak etanol daun katuk. 9,06 mL nutrisi agar dimasukkan ke dalam *plate* berlabel 9,4% lalu ditambahkan 0,94 mL ekstrak etanol daun katuk. 9,08 mL nutrisi agar dimasukkan ke dalam *plate* berlabel 9,2% lalu ditambahkan 0,92 mL ekstrak etanol daun katuk. Campuran dibuat lebih homogen dengan di *vorteks*. Media agar tersebut didiamkan pada *laminary cabinet* hingga mengeras dan uap menghilang. *Plate* dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam untuk memastikan agar dalam *plate* tidak terkontaminasi. *Plate* dibagi menjadi 4 bagian sama luas dengan

spidol marker. Setiap bagian pada masing-masing *plate* ditetesi bakteri uji dengan volume 10 μL dari konsentrasi 1×10^6 CFU/mL lalu ditunggu hingga meresap. Semua *plate* diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37 selama 18-24 jam. Koloni *Escherichia coli* yang tumbuh diamati perkembangannya. Konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak ada pertumbuhan koloni *Escherichia coli* disebut sebagai KHM (Kadar Hambat Minimal). Analisis dibuat dari data yang diperoleh dan hasil percobaan yang telah dilakukan.





Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian.

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data dari hasil pertumbuhan koloni *Escherichia coli* pada agar plate yang telah diinkubasikan pada suhu 37 selama 18-24 jam berupa data konsentrasi ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus*) dan pertumbuhan koloni bakteri. Analisis yang digunakan adalah uji statistik Kruskal Wallis untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun katuk terhadap *Escherichia coli*. Apabila hasil analisis Kruskal wallis signifikan, maka dilanjutkan dengan uji Mann Whitney untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan, melakukan juga uji korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian ekstrak daun katuk dengan pertumbuhan koloni *Escherichia coli*. Dalam penelitian ini, besar kepercayaan yang dipakai adalah 95% untuk tingkat signifikansi ($\alpha = 0,05$).