

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

## 4.1 Desain Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental dengan desain *post test control group*. Uji antimikroba menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun katuk yang dapat mempengaruhi isolat bakteri *Salmonella Typhi* secara *in vitro*. Metode ini dipakai untuk menentukan nilai KHM.

## 4.2 Estimasi Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel berupa bakteri *Salmonella Typhi* dengan kepadatan  $10^6$  CFU/mL yang dikembangbiakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya 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 *Salmonella Typhi* tanpa diberi ekstrak etanol daun katuk ( $p=6+1=7$ ) maka didapatkan jumlah pengulangan:

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5 \approx 3$$

Dengan demikian, untuk memenuhi persyaratan uji statistik diperlukan 3 kali pengulangan *Salmonella Typhi*.

#### 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 hasil eksplorasi dosis pada percobaan awalan (9,2%, 9,4%, 9,6%, 9,8%, dan 10 %).

##### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi*.

#### 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

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

#### 4.5 Definisi Operasional

- a. Daun katuk (*Sauropus androgynus*) yang digunakan adalah daun katuk tua yang berwarna hijau tua yang didapatkan dari Balai Materia Medika, Batu, Malang.

- b. Ekstrak etanol daun katuk didapatkan dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi terhadap daun katuk kering, kemudian dilakukan penyaringan dan penguapan dengan menggunakan *rotary-evaporator*.
- c. Bakteri *Salmonella* Typhi didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- d. Yang disebut KHM (Kadar Hambat Minimum) adalah konsentrasi minimum ekstrak etanol daun katuk yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella* Typhi. Hal ini ditandai dengan tidak ada pertumbuhan koloni pada NAP (*Nutrient Agar Plate*) yang telah dicampur ekstrak etanol daun katuk dan diberi bakteri uji.

#### 4.6 Alat dan Bahan

##### 4.6.1 Alat

Alat yang digunakan untuk identifikasi dan tes kepekaan bakteri *Salmonella* Typhi adalah cawan petri, ose, tabung reaksi, labu Erlenmeyer, termometer, inkubator, gelas obyek, korek api, spidol permanen, pipet steril 10 mL, mikroskop, oven, bunsen, plate, *colony counter*, dan *cuvet*.

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

##### 4.6.2 Bahan

Bahan untuk identifikasi *Salmonella* Typhi yaitu biakan murni *Salmonella* Typhi 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), ethanol 96% dan *aquadest* steril. Bahan uji kepekaan ekstrak etanol daun katuk terdiri dari satu isolate *Salmonella* Typhi, 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 etanol daun katuk dimulai dengan persiapan sampel daun katuk, dilanjutkan pembuatan sediaan ekstrak etanol 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

Daun katuk yang sudah dalam bentuk serbuk ditimbang (200 gram). Sampel kering tersebut dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer ukuran 1 liter. Kemudian direndam dengan etanol 96% hingga volumenya 600 mL. Dikocok hingga benar-benar tercampur ( $\pm$  30 menit). Didiamkan selama 1 malam sampai mengendap. Setelah 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

Diambil lapisan atau campuran etanol dengan zat aktif daun katuk yang sudah terlarut, 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 78°C, sesuai dengan titik didih etanol (Buckley, 2006), lalu disambungkan dengan aliran listrik. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada di dalam labu. Ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ( $\pm$  1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu). Masukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik dan masukkan dalam freezer. Hasil evaporasi berupa cairan kental. Dalam penelitian ini hasil evaporasi dianggap konsentrasi 100%.

#### 4.7.2 Identifikasi Bakteri *Salmonella* Typhi

Isolat bakteri yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi selanjutnya diidentifikasi ulang, meliputi pewarnaan Gram dan uji biokimia pada *Microbact*<sup>TM</sup> 12A/12E.

##### 4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Langkah-langkah melakukan pewarnaan Gram adalah sebagai berikut: Bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak. Kemudian biarkan dingin. Buat sediaan bakteri diatas gelas obyek dengan ketebalan yang cukup (tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis) dan biarkan kering diudara. Kemudian difiksasi diatas lampu Bunsen. Sediaan dituangi dengan Kristal Violet. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air. Kemudian sediaan dituangi dengan Lugol. Setelah 1 menit, sediaan di bilas dengan air. Sediaan dituangi dengan

alkohol 96%. Setelah 5-10 detik, sediaan dibilas dengan air. Sediaan dituangi dengan Safranin. Setelah setengah menit, sediaan dibilas dengan air. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran obyektif 100x. (Santoso *et al*, 2010). Hasil positif: *Salmonella* Typhi berbentuk batang dan berwarna merah (bersifat Gram negatif).

#### 4.7.2.2 Uji Biokimia

Uji biokimia dilakukan dengan menggunakan *Microbact*<sup>TM</sup> 12A *Gram-Negative Identification System*. Sistem *Microbact*<sup>TM</sup> 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*<sup>TM</sup> adalah sebagai berikut:

1. Sebelum ditentukan menggunakan 12A/12E atau 24E, koloni bakteri dilakukan uji oksidase, jika hasil oksidase negatif menggunakan sistem *Microbact*<sup>TM</sup> 12A/12E saja, sedangkan jika hasil oksidasenya positif maka menggunakan jenis 24E. Untuk bakteri *Salmonella* Typhi dikarenakan mempunyai hasil oksidase yang negatif, maka menggunakan sistem *Microbact*<sup>TM</sup> 12A/12E.
2. Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan ke dalam 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*<sup>TM</sup> sebanyak 100 UI (4 tetes), untuk sumur 1 Lysin,

sumur 2 Omitin, dan sumur 3 H<sub>2</sub>S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact*<sup>TM</sup> diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

4. *Microbact*<sup>TM</sup> yang telah diinkubasi diambil kemudian ditetaskan 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*<sup>TM</sup> adalah sebagai berikut:

1. Sumur 1, *Lysine*, memberikan hasil negatif berwarna kuning dan hasil positif berwarna biru kehijauan. Pada bakteri *Salmonella Typhi* ditemukan hasil positif.
2. Sumur 2, *Omithine*, memberikan hasil negatif berwarna kuning kehijauan dan hasil positif berwarna biru. Pada bakteri *Salmonella Typhi* ditemukan hasil positif.
3. Sumur 3, *H<sub>2</sub>S*, memberikan hasil negatif berwarna kekuningan dan hasil positif berwarna hitam. Pada bakteri *Salmonella Typhi* ditemukan hasil negatif.
4. Sumur 4, *Glucose*, memberikan hasil negatif berwarna biru kehijauan dan hasil positif berwarna kuning. Pada bakteri *Salmonella Typhi* ditemukan hasil positif.

5. Sumur 5, *Mannitol*, memberikan hasil negatif berwarna biru kehijauan dan hasil positif berwarna kuning. Pada bakteri *Salmonella Typhi* ditemukan hasil positif. Pada bakteri *Salmonella Typhi* ditemukan hasil positif.
6. Sumur 6, *Xylose*, memberikan hasil negatif berwarna biru kehijauan dan hasil positif berwarna kuning. Pada bakteri *Salmonella Typhi* ditemukan hasil positif.
7. Sumur 7, ONPG (*Hydrolysis of o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside*), memberikan hasil negatif tidak berwarna dan hasil positif berwarna kuning. Pada bakteri *Salmonella Typhi* ditemukan hasil positif.
8. Sumur 8, *Indol*, memberikan hasil negatif tidak berwarna dan hasil positif berwarna merah muda. Pada bakteri *Salmonella Typhi* ditemukan hasil positif.
9. Sumur 9, *Urease*, memberikan hasil negatif berwarna kekuningan dan hasil positif berwarna merah muda. Pada bakteri *Salmonella Typhi* ditemukan hasil negatif.
10. Sumur 10, *VP (Voges-Proskauer Reaction)*, memberikan hasil negatif berwarna kekuningan dan hasil positif berwarna merah muda. Pada bakteri *Salmonella Typhi* ditemukan hasil negatif.
11. Sumur 11, *Citrate*, memberikan hasil negatif berwarna hijau dan hasil positif berwarna biru. Pada bakteri *Salmonella Typhi* 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 *Salmonella* Typhi ditemukan hasil negative.

#### 4.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Ambil koloni *Salmonella* Typhi dengan karakteristik sama dari media *Nutrient Agar Plate* dengan menggunakan ose. Masukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient broth*, kemudian lakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625nm, untuk mengetahui *optical density* (OD) dari suspensi tersebut. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar  $10^8$ /mL yang setara dengan OD (*Optical Density*) = 0,1 (Murray *et al*, 1999), lakukan 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)

Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan 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

Rangkaian uji antibakteri ekstrak etanol daun katuk adalah sebagai berikut:

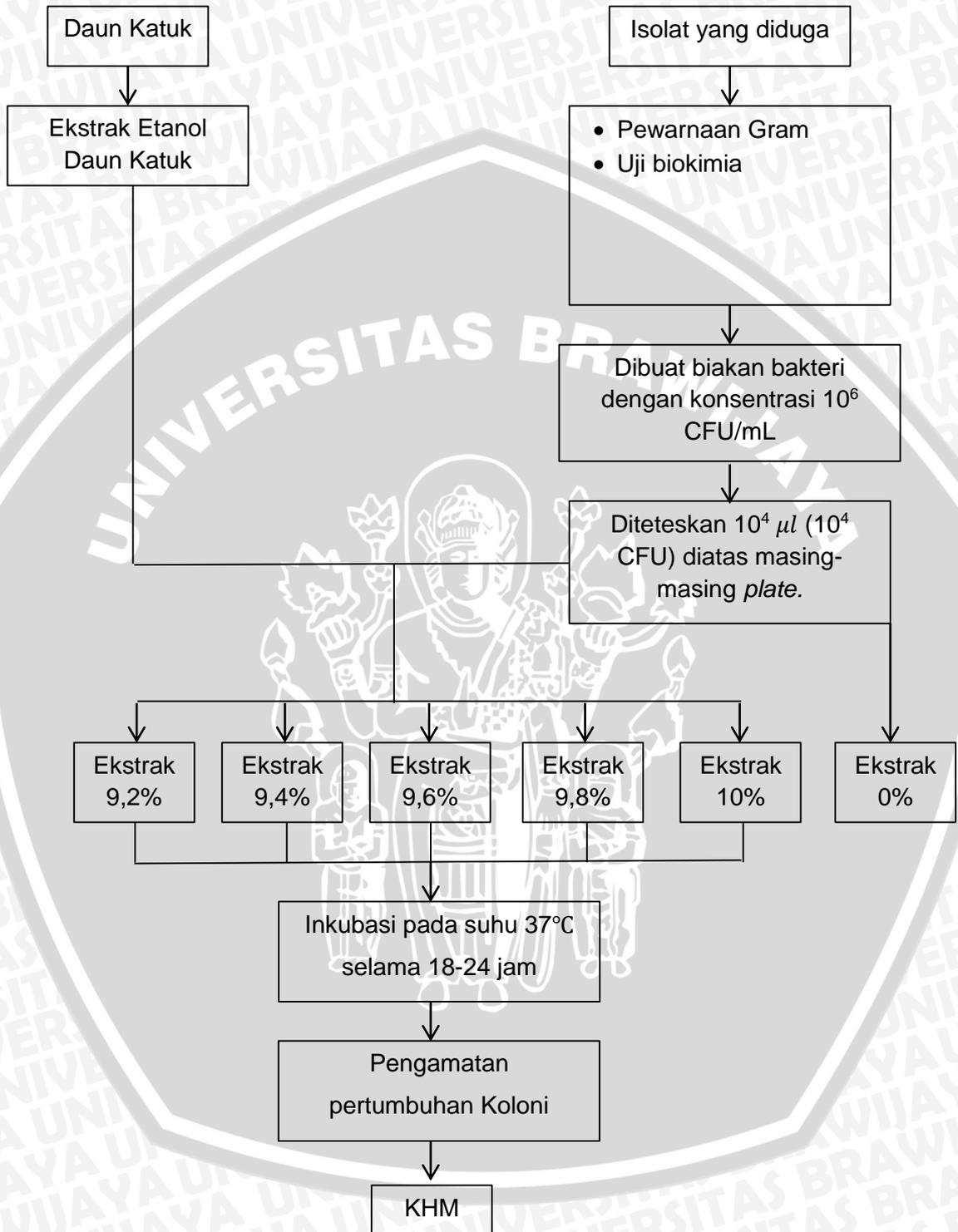
Siapkan 6 plate steril, beri tanda 9,2%; 9,4%; 9,6%; 9,8%; dan 10% serta 0%.

Masukkan 10 mL nutrien agar ke dalam *plate* bertanda 0%. Masukkan 9,08 mL

nutrien agar ke dalam *plate* berlabel 9,2% lalu tambahkan 0,92 mL ekstrak etanol

daun katuk. Masukkan 9,06 mL nutrien agar ke dalam *plate* berlabel 9,4% lalu

tambahkan 0,94 mL ekstrak etanol daun katuk. Masukkan 9,04 mL nutrisi agar ke dalam *plate* berlabel 9,6% lalu tambahkan 0,96 mL ekstrak etanol daun katuk. Masukkan 9,02 mL nutrisi agar ke dalam *plate* berlabel 9,8% lalu tambahkan 0,98 mL ekstrak etanol daun katuk. Masukkan 9 mL nutrisi agar ke dalam *plate* berlabel 10% lalu tambahkan 1 mL ekstrak etanol daun katuk. Membuat campuran lebih homogen dengan di *vorteks*. Diamkan media agar tersebut pada *laminary cabinet* hingga mengeras dan uap menghilang. Masukkan *plate* ke dalam inkubator selama 24 jam, untuk memastikan agar dalam *plate* tidak terkontaminasi. Bagi *plate* menjadi 4 bagian sama luas dengan spidol marker. Setiap bagian pada masing-masing *plate* ditetesi bakteri uji dengan konsentrasi  $10^4 \mu\text{l}$  dari konsentrasi  $1 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$ . Tunggu meresap. Semua *plate* diinkubasi dalam inkubator dengan suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 18-24 jam. Amati koloni *Salmonella Typhi* yang tumbuh. Konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak ada pertumbuhan koloni *Salmonella Typhi* disebut sebagai KHM (Kadar Hambat Minimal). Dibuat analisis dan kesimpulan mengenai data yang diperoleh dari hasil percobaan yang telah dilakukan.



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian.

#### 4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data dari hasil pertumbuhan koloni *Salmonella Typhi* pada *agar plate* yang telah diinkubasikan pada suhu 37°C 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 *Salmonella Typhi*. Apabila hasil analisis Kruskal wallis signifikan, maka dilanjutkan dengan uji Mann Whitney untuk mengetahui ekstrak etanol daun katuk yang berbeda signifikan, melakukan juga uji korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian ekstrak etanol daun katuk dengan pertumbuhan koloni *Salmonella Typhi*. Dalam penelitian ini, besar kepercayaan yang dipakai adalah 95% untuk tingkat signifikansi ( $\alpha = 0,05$ ).