

BAB 4

Metode Penelitian

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *true eksperimental Post control design* secara *in vitro*. Dimana untuk mengetahui KHM dan KBM, akan digunakan metode dilusi tabung, ekstrak etanol kulit pisang Cavendish didapat dengan cara ekstraksi metode maserasi dengan pelarut etanol. Pada proses ekstraksi etanol dipilih sebagai pelarut karena dapat melarutkan zat – zat aktif yang ada pada kulit pisang *Cavendish*.

4.2 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang pada tanggal 1 Maret 2015 sampai dengan 1 Juni 2015 dimana sebelumnya proses ekstraksi dilakukan di Unit Pelaksana Teknis Materia Medika, Batu.

4.3 Sampel dan Besar Sampel

Sampel yang digunakan adalah isolat bakteri *S. pyogenes* yang akan mendapat perlakuan sebanyak lima perlakuan berdasarkan jumlah konsentrasi ekstrak kulit pisang kavendis (konsentrasi I, II, III, IV dan V) yang rentannya akan diketahui setelah penelitian eksplorasi.

Sehingga estimasi jumlah pengulangan dapat diketahui dengan rumus berikut (Loekito, 1998) :

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

keterangan :

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan

karena jumlah perlakuan adalah lima maka :

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut maka setiap perlakuan akan dilakukan pengulangan sebanyak empat kali.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi dari ekstrak kulit pisang Cavendish, dimana terdapat lima konsentrasi (3%, 4%, 5%, 6%, 7%) yang ditentukan sebagai konsentrasi eksplorasi pada penelitian pendahuluan. Rentang konsentrasi yang sebenarnya akan diketahui setelah penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *S. pyogenes* dengan melihat tingkat kekeruhan yang dihasilkan pada media cair untuk mencari KHM (Kadar Hambat Minimum) dan jumlah koloni pada media padat sebagai parameter KBM (Kadar Bunuh Minimum)

4.5 Definisi Operasional

- KHM adalah kadar hambat minimum, yaitu konsentrasi ekstrak etanol kulit pisang Cavendish terendah yang mampu menghambat bakteri *S.*

pyogenes, ditandai dengan hasil biakan yang dibandingkan dengan tampak larutan kontrol jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri), setelah di inkubasi 18-24 jam.

- KBM adalah kadar bunuh minimum, yaitu konsentrasi ekstrak etanol kulit pisang Cavendish terendah yang dapat membunuh koloni *S. pyogenes* yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni sama sekali. (Rafaela, 2013)

4.6 Alat dan Bahan

1.6.1 Ekstraksi Kulit Pisang Cavendish Sebagai Bahan Uji

Alat dan bahan yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol kulit pisang Cavendish diantaranya kulit pisang Cavendish, etanol 96%, kertas saring, toples bertutup, corong gelas, timbangan analitik, gelas ukur, botol, *Erlenmeyer*, *rotatory evaporatory* besar, *beaker glass*, *shaker digital*, *waterbath*.

1.6.2 Identifikasi Bakteri

Alat dan bahan yang digunakan dalam identifikasi bakteri antara lain isolat bakteri, bahan – bahan pengecatan gram (Krista Violet, Lugol, Alkohol, dan Safranin), *Mueller Hinton Agar*, *Blood Agar Plate*, cakram Basitrasin, ose dan bunsen, *object glass*, minyak emersi, mikroskop.

1.6.3 Dilusi Tabung

Alat yang digunakan untuk uji dilusi tabung antara lain tabung reaksi dengan label konsentrasi, tabung reaksi untuk kontrol bakteri dan ekstrak, pipet steril, inkubator, hasil ekstraksi, perbenihan cairan bakteri dengan kepadatan 10^6 bakteri/ml, *aquades*, *vortex*.

1.6.4 *Streaking Plate*

Alat yang digunakan untuk *streaking plate* adalah media *Mueller Hinton Agar*, ose, bunsen dan *vortex*.

1.6.5 Pembuatan Bahan Cair Bakteri

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan bahan cair bakteri, tabung reaksi, media *Mueller Hinton Broth*, larutan NaCl, pipet steril, spirometri dan *vortex*.

4.7 Alur Operasional

4.7.1 Pembuatan Bahan Uji

Bahan uji didapat melalui proses ekstraksi, sebagai berikut :

- 1) Timbang kulit pisang Cavendish sebanyak 300 g, kemudian haluskan.
- 2) Tambah pelarut etanol 96% sebanyak 700 ml.
- 3) Masukkan kulit pisang Cavendish halus yang telah ditambahi dengan pelarut ke dalam toples, diratakan dan sambil ditambahkan lagi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 800 ml sampai terendam. Tutup toples dengan rapat selama 48 jam dan diaduk diatas *shaker* digital rpm 50.
- 4) Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam *Erlenmeyer*.
- 5) Lakukan remaserasi pada ampas sebanyak satu kali dengan cara dimasukan kembali ke dalam toples dan ditambahkan dengan pelarut sampai terendam (minimal 5 cm di atas permukaan serbuk). Kemudian dibiarkan semalam atau 48 jam di atas *shaker*. Remaserasi

dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1000ml.

- 6) Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan *rotatory evaporatory*. Diperlukan waktu 2 jam untuk evaporasi.
- 7) Ekstrak cair yang dihasilkan kemudian di evaporasi/diuapkan kembali di atas waterbath selama 2 jam.

dari 300 kulit pisang Cavendish yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 2500 ml dihasilkan ekstrak cair sebanyak 58 ml.

4.7.2 Identifikasi *S. pyogenes*

Identifikasi bakteri *S. pyogenes* dilakukan melalui sejumlah tes yaitu pewarnaan Gram, tes hemolitik, dan tes cakram basitrasin. Test pewarnaan Gram ditujukan untuk membedakan gram positif dan negatif, sedangkan tes hemolitik bertujuan mengetahui sifat hemolitik bakteri, hasil yang diharapkan adalah terjadi hemolitik total pada media BAP, karena *S. pyogenes* bersifat beta hemolitikus. Tes cakram basitrasin bertujuan untuk membedakan bakteri *S. pyogenes* dengan bakteri *Streptococcus* lainnya, dimana pada *S. pyogenes* akan terdapat zona hambat di sekitar cakram basitrasin.

1) Pewarnaan Gram

- a. *Object glass* dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak kemudian biarkan menjadi dingin.
- b. Buat hapusan bakteri *S. pyogenes* pada *object glass* menggunakan ose dengan ketebalan yang sesuai (tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis). Setelah mengering di udara, lakukan

fiksasi dengan cara melewatkan *object glass* diatas api pada bunsen kurang lebih sebanyak tiga kali.

- c. Genangi hapusan menggunakan kristal violet selama satu menit, kemudian bilas hapusan menggunakan *aquades*.
- d. Genangi hapusan menggunakan lugol selama satu menit, kemudian bilas hapusan menggunakan *aquades*.
- e. Genangi hapusan menggunakan alkohol 96% selama lima sampai sepuluh detik, kemudian bilas hapusan menggunakan *aquades*.
- f. Selanjutnya, genangi hapusan menggunakan safranin selama tiga puluh detik, sehingga akan terlihat lunturnya cat, kemudian bilas hapusan menggunakan *aquades*.
- g. Setelah dibilas, keringkan menggunakan tisu secara perlahan.

2) Tes Cakram Basitrasin

Media *Blood Agar Plate (BAP)* yang sebelumnya diinokulasikan koloni *S. pyogenes*, akan ditempli cakram Basitrasin. Pada uji kepekaan ini akan diketahui bahwa bakteri *S. pyogenes* yang memiliki sifat sebagai bakteri beta hemolitikus akan terjadi hemolisis total pada media ini, dan akan diketahui pula bahwa koloni tersebut sensitif dengan Basitrasin yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri di sekitar cakram yang mengandung Basitrasin. (Neal Chamberlain, 2002)

4.7.3 Pembuatan Pembenuhan Cair Bakteri dengan Kepadatan 10^6 bakteri/ml

Suspensi bakteri pada *Mueller Hinton Broth* diukur menggunakan spektometri dengan panjang gelombang 625 nm sehingga diketahui *Optical Density* dari suspensi tersebut. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar

10^8 bakteri/ml yang setara dengan *Optical Density* = 0,1. Selanjutnya, dilakukan pengenceran menggunakan rumus sebagai berikut :

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

Keterangan :

N1 : Hasil spektometri

V1 : Volume Bakteri yang akan ditambah dengan pengencer

N2 : OD (0,1 yang setara dengan 10^8 bakteri/ml)

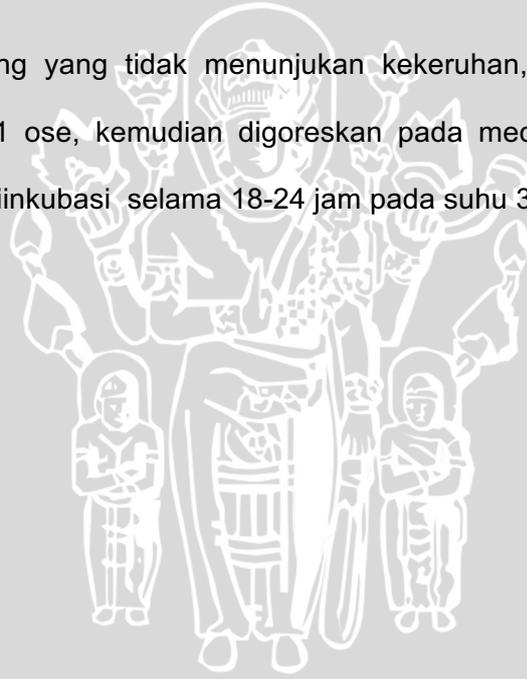
V2 : Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

Dengan menggunakan rumus ini akan didapatkan volume bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 sel bakteri/ml sebanyak 10 ml. Setelah itu dilakukan pengenceran sebanyak seratus kali, sehingga akan didapat konsentrasi bakteri sebesar 10^6 bakteri/ml. Suspensi bakteri telah siap untuk digunakan untuk uji selanjutnya.

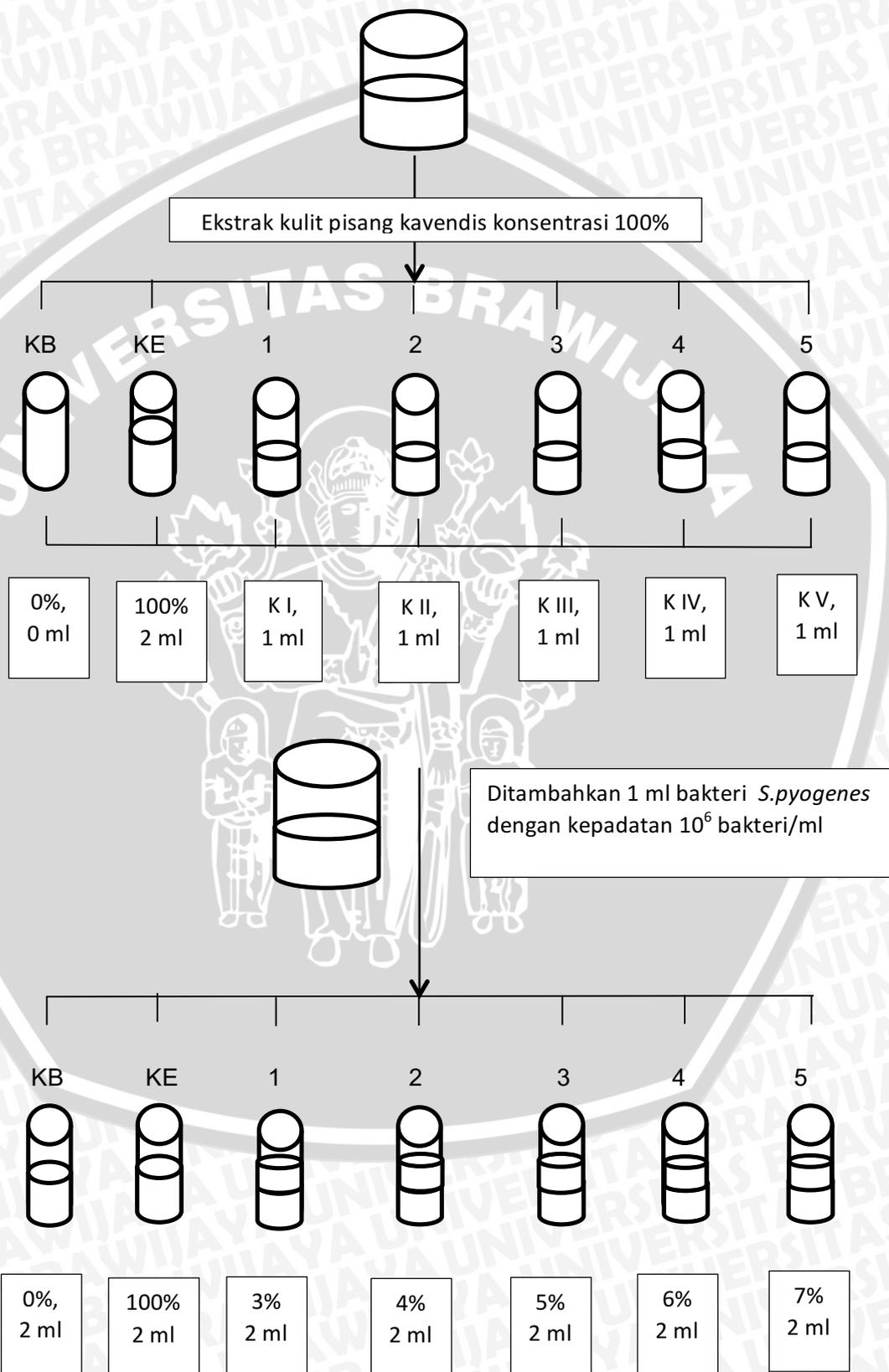
4.7.4 Uji Efek Anti Bakteri

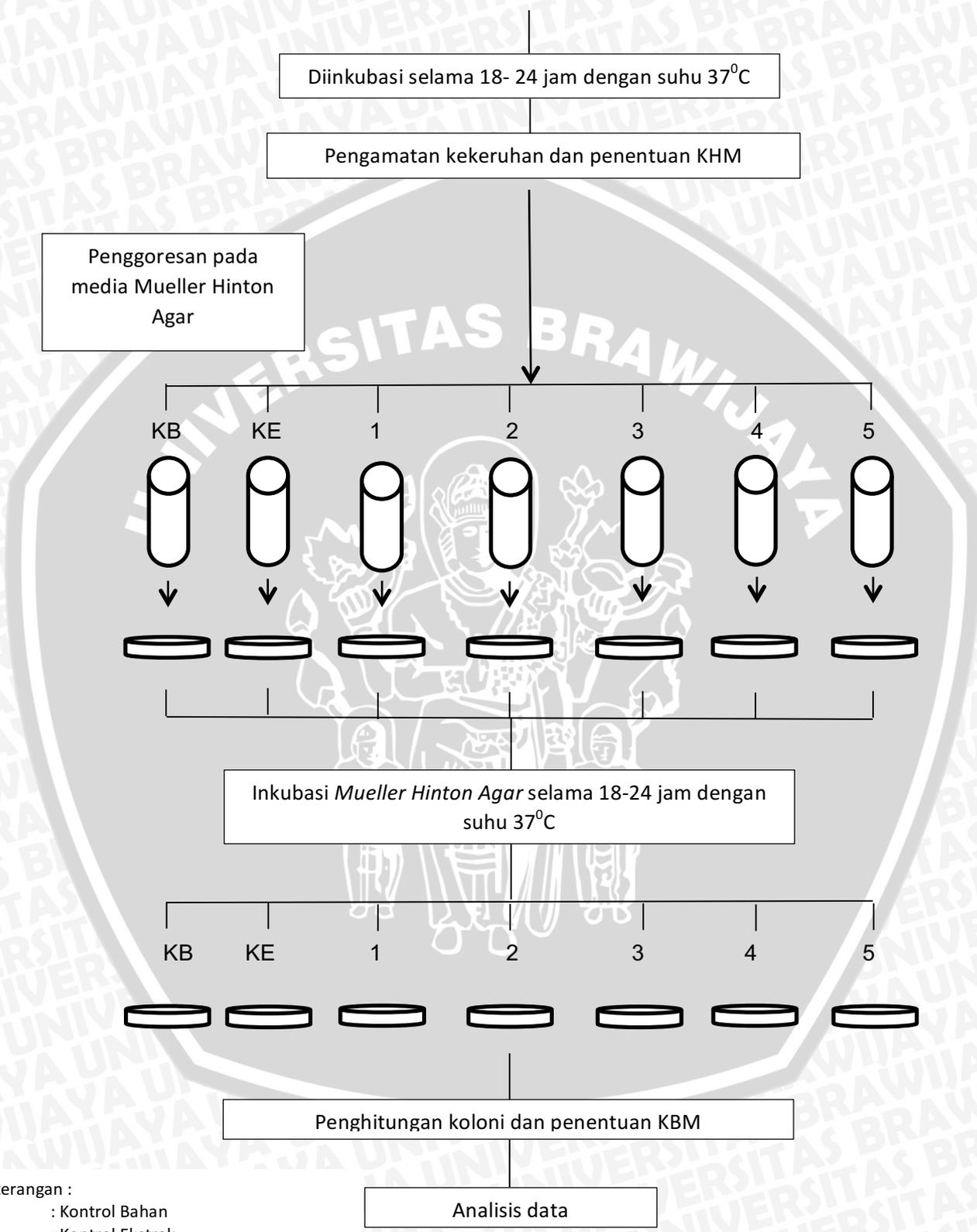
- 1) Siapkan 7 tabung steril, 5 tabung reaksi untuk setiap perlakuan dan dua tabung untuk kontrol, yaitu Kontrol Bakteri (KB), dan Kontrol Ekstrak (KE).
- 2) Hal pertama yang harus dilakukan adalah melakukan penelitian eksplorasi untuk mengetahui rentan konsentrasi yang sesungguhnya. Setiap tabung (tabung 1 – 5) diisi dengan ekstrak kulit pisang Cavendish dengan konsentrasi 3%, 4%, 5%, 6% dan 7%.
- 3) Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi 10^6 bakteri/ml, lalu tabung satu sampai dengan lima serta Kontrol Bakteri (KB), setiap tabungnya akan dimasukkan suspensi bakteri *S. pyogenes* sebanyak 1 ml dengan konsentrasi sebesar 10^6 bakteri/ml.
- 4) Semua tabung diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C .
- 5) Hari selanjutnya tabung dikeluarkan dari inkubator.

- 6) Melakukan pengamatan kekeruhan yang terjadi pada setiap tabung dan tentukan KHM. Tingkat kekeruhan dapat dinilai dengan cara membandingkan dengan kontrol ekstrak, dan dengan cara menggunakan kertas putih yang sudah diberikan garis hitam sebelumnya dengan ketebalan yang berbeda yang di letakkan di belakang tabung, apabila warna garis dapat terlihat jelas, hal tersebut menunjukkan bahwa tabung tersebut memiliki kejernihan yang tinggi, dengan kata lain terjadi penghambatan pertumbuhan dari koloni *S. pyogenes*
- 7) Pada tabung yang tidak menunjukkan kekeruhan, diambil suspensi sebanyak 1 ose, kemudian digoreskan pada media *Mueller Hinton Agar* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.



4.7.5 Alur Penelitian





Keterangan :

- KB : Kontrol Bahan
- KE : Kontrol Ekstrak
- 1 : 3%
- 2 : 4%
- 3 : 5%
- 4 : 6%
- 5 : 7%

Gambar 4.1 Alur Penelitian



4.8 Pengumpulan Data

Data yang diperoleh berupa data kuantitatif dan data kualitatif. Data kualitatif didapatkan dengan cara melihat tingkat kekeruhan. Data kuantitatif didapatkan dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri *S. pyogenes* menggunakan *colony counter* pada media *Mueller Hinton Agar*.

4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji distribusi dan homogenitas varian, apabila data terdistribusi normal maka teknik analisis data yang digunakan baik untuk data kuantitatif maupun kualitatif adalah *one-way ANOVA*. Uji statistik *one-way ANOVA* dilakukan untuk mengetahui adanya pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol kulit pisang Cavendish dengan pertumbuhan koloni *S. pyogenes*. Apabila ditemukan data tidak homogen dan/atau tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji non-parametrik sebagai uji alternatif yaitu uji Kruskal Wallis. Sedangkan uji statistik korelasi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol kulit pisang Cavendish terhadap pertumbuhan koloni *S. pyogenes*. Analisis statistika dilakukan pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).