

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true experimental posttest only control group design*, dengan fokus penelitian pada keadaan bakteri *Enterococcus faecalis* setelah perlakuan berupa pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata L.*) secara *in vitro*. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan bahwa ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata L.*) memiliki efek antimikroba terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* secara *in vitro* dan perbandingannya dengan klorheksidin 2% sebagai medikamentosa saluran akar yang sudah terbukti efektif terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* dengan metode difusi sumuran (Delgado *et al.*, 2010).

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Enterococcus faecalis* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.1 Estimasi Jumlah Pengulangan

Jumlah pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan rumus Federer (1995)

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

Keterangan :

t : jumlah perlakuan dalam penelitian

r : jumlah perlakuan ulang (sampel)

Dalam penelitian ini digunakan 8 macam perlakuan, yaitu ekstrak dengan konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, kontrol kuman berupa bakteri *Enterococcus faecalis* yang diberi akuades dan klorheksidin 2% sebagai pembanding, maka :

$$(8 - 1) \times (r - 1) \geq 15$$

$$7 \times (r - 1) \geq 15$$

$$7r - 7 \geq 15$$

$$7r \geq 22$$

$$r \geq 3,14$$

Jumlah perlakuan ulang (r) yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3,14 yang kemudian dibulatkan menjadi 4 kali pengulangan.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*, diukur dengan berbagai diameter zona inhibisi pada media BHIA yang terbentuk dalam milimeter dengan menggunakan jangka sorong.

4.3.2 Variabel Bebas

Ekstrak etanol daun ketepeng cina 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, akuades, dan klorheksidin 2% sebagai pembanding. Konsentrasi tersebut diperoleh melalui penelitian pendahuluan.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Juli 2015 sampai Agustus 2015.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

4.5.1.1 Alat untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

1. *Objectglass*
2. Pipet
3. Bunsen
4. Ose
5. Korek api
6. Wadah pengecatan

4.5.1.2 Alat untuk Tes Katalase

1. *Objectglass*
2. Pipet
3. Tabung reaksi

4.5.1.3 Alat untuk Tes Toleransi Garam (*Salt Tolerance Test*)

1. Tabung reaksi
2. Pipet
3. Inkubator

4.5.1.4 Alat untuk Tes Fermentasi Manitol

1. Mikropipet
2. Ose
3. Tabung reaksi

4. Alat vorteks
5. Cawan petri

4.5.1.5 Alat untuk Tes Hemolisis

1. Ose
2. Inkubator
3. Bunsen
4. Cawan petri

4.5.1.6 Alat untuk Ekstraksi Daun Ketepeng Cina

1. Timbangan
2. Blender
3. Perkolator
4. Erlenmeyer
5. *Vacuum rotavapor*
6. *Electronic balance*
7. Autoklaf
8. *Vortex/whirli mixer*

4.5.1.7 Alat untuk Tes Difusi Sumuran (Uji Antimikroba Ekstrak Ketepeng Cina)

1. Tabung reaksi
2. Cawan petri
3. Mikropipet
4. Inkubator
5. Pinset steril
6. *Spreader*
7. Jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm



8. Perforator berdiameter 5 mm
9. *Spectrophotometer*

4.5.2 Bahan

4.5.2.1 Bahan untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

1. Pewarnaan gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin)
2. Biakan bakteri *Enterococcus faecalis*
3. Kertas penghisap

4.5.2.2 Bahan untuk Tes Katalase

1. Perbenihan cair
2. H₂O₂ 3%
3. Biakan bakteri *Enterococcus faecalis*

4.5.2.3 Bahan untuk Tes Toleransi Garam (*Salt Tolerance Test*)

1. NaCl
2. BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*)
3. Biakan bakteri *Enterococcus faecalis*

4.5.2.4 Bahan untuk Tes Fermentasi Manitol

1. Media MSA (*Mannitol Salt Agar*)
2. *Normal saline* (NaCl 0,9%)
3. Akuades
4. Biakan bakteri *Enterococcus faecalis*

4.5.2.5 Bahan untuk Tes Hemolisis

1. *Blood Agar Plate* (BAP)
2. Biakan bakteri *Enterococcus faecalis*

4.5.2.6 Bahan untuk Ekstraksi Daun Ketepeng Cina

1. Daun ketepeng cina 200 gram

2. Etanol 96% 200 ml
3. MHB (*Mueller Hinton Broth*)
4. Kapas 250 g
5. Kertas saring (*Whatman no. 42, England*)
6. Aluminium foil 1 gulungan
7. Kertas perkamen

4.5.2.7 Bahan untuk Tes Difusi Sumuran (Uji Antimikroba Ekstrak Ketepeng

Cina)

1. Ekstrak daun ketepeng cina
2. MHA (*Mueller Hinton Agar*)
3. Kultur bakteri *Enterococcus faecalis*
4. Klorheksidin 2%
5. Akuades

4.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol daun ketepeng cina adalah ekstrak yang diperoleh dengan melakukan ekstraksi daun ketepeng cina kering yang telah dihaluskan dengan pelarut etanol 96% kemudian diuapkan dengan *rotavapor* sehingga diperoleh ekstrak kental daun ketepeng cina.
2. *Enterococcus faecalis* yang digunakan adalah bakteri *Enterococcus faecalis* yang berasal dari ATCC *Enterococcus faecalis* dan kemudian dikultur pada media MHA dalam suasana anaerob di Laboratorium Mikrobiologi FKUB.
3. Kontrol kuman adalah larutan bakteri dan 0% ekstrak yang dilarutkan dengan menggunakan akuades.

4. Kontrol bahan adalah plate yang hanya berisi ekstrak daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) dengan konsentrasi 100%.
5. Kelompok perlakuan adalah kelompok dengan perlakuan ekstrak etanol daun ketepeng cina dengan konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.
6. Kelompok pembanding adalah kelompok dengan perlakuan klorheksidin 2% yang merupakan antimikroba *broad spectrum* yang sudah terbukti efektif terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* dan bekerja dengan membentuk ion negatif fosfat pada dinding sel sehingga menyebabkan kebocoran sel (Delgado *et al.*, 2010).
7. Daya antimikroba ditunjukkan dengan adanya zona inhibisi. Zona inhibisi menunjukkan kemampuan suatu bahan dalam menghambat pertumbuhan bakteri, yang dalam penelitian ini ditandai dengan adanya daerah jernih di sekitar sumuran. Diameter zona inhibisi diukur dengan menggunakan jangka sorong dengan satuan mm.

4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari prosedur identifikasi bakteri *Enterococcus faecalis* (pewarnaan Gram, tes katalase, tes toleransi garam, tes biokimia dan tes hemolisis), pembiakan sampel bakteri *Enterococcus faecalis*, ekstraksi daun ketepeng cina dengan menggunakan etanol, dan dilanjutkan dengan penelitian pendahuluan, uji aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*, serta dilakukan pengamatan dan pengukuran zona inhibisi (difusi sumuran).

4.7.1 Tes Identifikasi Bakteri

4.7.1.1 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

1. Dibuat suspensi air suling dan koloni bakteri pada *objectglass* dan diangin-anginkan.
2. Setelah kering lakukan fiksasi di atas api bunsen.
3. Sediaan dituangi kristal violet selama 1 menit.
4. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
5. Sediaan dituangi lugol selama 1 menit.
6. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik.
8. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
9. Sediaan dituangi safranin selama 0,5 menit.
10. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
11. Dikeringkan dengan kertas penghisap.
12. Diamati dengan mikroskop pembesaran 1000x dengan intensitas cahaya rendah.
13. Hasil untuk *Enterococcus faecalis* berupa bakteri gram positif berbentuk kokus sedikit lonjong (ovoid).

4.7.1.2 Tes Katalase

1. Sediakan pembenihan cair bakteri pada gelas objek.
2. Sediaan tersebut ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3%.
3. Diamati ada tidaknya gelembung udara yang terjadi.
4. Hasil untuk *Enterococcus faecalis* adalah katalase negatif (tidak terbentuk gelembung udara).

4.7.1.3 Tes Toleransi Garam (*Salt Tolerance Test*)

1. Campurkan NaCl dengan BHIB hingga terbentuk konsentrasi 6,5%.

2. Masukkan 1–2 koloni dari kultur yang berusia 18–24 jam ke larutan NaCl 6,5%.
3. Masukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.
4. Periksa dan amati untuk pertumbuhan bakteri hingga maksimal 48 jam.
5. Hasil untuk *Enterococcus faecalis* adalah terlihat kekeruhan dalam larutan dengan atau tanpa perubahan warna dari ungu menjadi kuning (Forbes, 2007).

4.7.1.4 Tes Fermentasi Manitol

1. Ambil biakan cair *Enterococcus faecalis* yang masih berusia 18–24 jam dengan menggunakan ose steril.
2. Lakukan streaking pada media MSA (*Mannitol Salt Agar*).
3. Inkubasi di inkubator pada suhu 37°C selama 18–24 jam.
4. Amati perubahan berupa ada tidaknya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* yang terjadi.
5. *Enterococcus faecalis* akan menunjukkan hasil tes positif terhadap manitol (Manero, 1999).

4.7.1.5 Tes Hemolisis

1. Melakukan streaking pada *Blood Agar Plate* (BAP).
2. Dengan ose steril, spesimen ditanam di media agar darah.
3. Inkubasi di inkubator pada suhu 37°C selama 18–24 jam.
4. Amati perubahan warna yang terjadi.
5. *Enterococcus faecalis* adalah hemolisis positif muncul sebagai adanya zona berwarna kehijauan (hemolisis alfa) sampai hampir transparan (hemolisis beta) (Triyana, 2013).

4.7.2 Pembiakan Spesimen *Enterococcus faecalis*

1. Strain bakteri *Enterococcus faecalis* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FKUB dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi *Brain Heart Infusion Broth (BHIB)*.
2. *Enterococcus faecalis* yang telah teridentifikasi, dibiakkan pada medium cair dengan menggunakan *BHIB* dan disimpan dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
3. Lalu *BHIB* berisi bakteri dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer kemudian diukur *Optical Density (OD)* atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda = 625 \text{ nm}$. Dari hasil yang diperoleh ($OD = 0,1$) sebanding dengan $1 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ kemudian dilakukan pengenceran hingga $1 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ dengan menggunakan rumus $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ (Murray, 1999).
4. Untuk mendapatkan suspensi bakteri yang mengandung $1 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ dilakukan pengenceran dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung $1 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,9% steril maka akan didapatkan suspensi $1 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$. Proses dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu $1 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ (Murray, 1999).
5. Dari hasil pengenceran itu, bakteri diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 1 cc dan diteteskan ke dalam cawan petri yang telah berisi media agar darah dan diratakan dengan ose.

4.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina

4.7.3.1 Ekstraksi Daun Ketepeng Cina

1. Daun ketepeng cina dicuci bersih dengan air mengalir lalu ditimbang sebanyak 1000 gram dengan *electronic balance*.
2. Kemudian dikeringkan di dalam lemari pengering dengan suhu 40°C selama 3 hari. Tanaman dikatakan sudah kering apabila bagian tanaman hancur ketika diremas.
3. Daun ketepeng cina yang telah kering kemudian ditimbang kembali dan dihaluskan dengan blender, diayak hingga didapatkan simplisia.
4. Letakkan simplisia kedalam wadah dan tuangkan etanol 96% sebanyak ± 800 ml untuk merendam simplisia, kemudian diamkan selama 1 jam dengan suhu 25°C.
5. Massa dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam perkolator dengan hati-hati sambil sesekali ditekan dengan sendok, kemudian tuangkan etanol 96% sebanyak 200 ml dan disaring dengan selapis kertas saring, biarkan sampai cairan mulai menetes untuk mengetahui apakah perkolator sudah berfungsi dengan baik.
6. Tutup perkolator dan dilakukan maserasi selama 24 jam.
7. Perkolator dibuka kembali dan cairan dibiarkan menetes dengan kecepatan ± 20 tetes/menit.
8. Tambahkan etanol secara berulang-ulang secukupnya hingga selalu terdapat selapis cairan penyari diatas simplisia sampai didapat 100 ml ekstrak cair.
9. Ekstrak cair diuapkan dengan alat *vacuum rotavapor* pada suhu 46°C hingga diperoleh ekstrak kental dengan konsistensi seperti madu.
10. Ekstrak daun ketepeng cina dimasukkan kedalam botol kaca tertutup lalu disimpan ditempat yang sejuk.

4.7.3.2 Pembuatan Suspensi Bahan Uji

Ekstrak daun ketepeng cina diambil dengan menggunakan mikropipet sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan dengan cara dilarutkan dengan akuades. Mula-mula dilarutkan 50 µl ekstrak kental daun ketepeng cina ke dalam 50 µl akuades untuk mendapatkan konsentrasi 100% ekstrak daun ketepeng cina. Konsentrasi 90% didapatkan dengan cara melarutkan 45 µl ekstrak kental daun ketepeng cina ke dalam 55 µl akuades. Konsentrasi 80% didapatkan dengan cara melarutkan 40 µl ekstrak kental daun ketepeng cina ke dalam 60 µl akuades dan seterusnya. Masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung dan diberi label.

4.7.4 Uji Antimikroba Ekstrak Daun Ketepeng Cina (Metode Difusi Sumuran)

Pada penelitian ini digunakan metode difusi sumuran dengan melakukan pengukuran zona inhibisi yang diukur menggunakan jangka sorong di sekitar sumuran yang berisi ekstrak daun ketepeng cina.

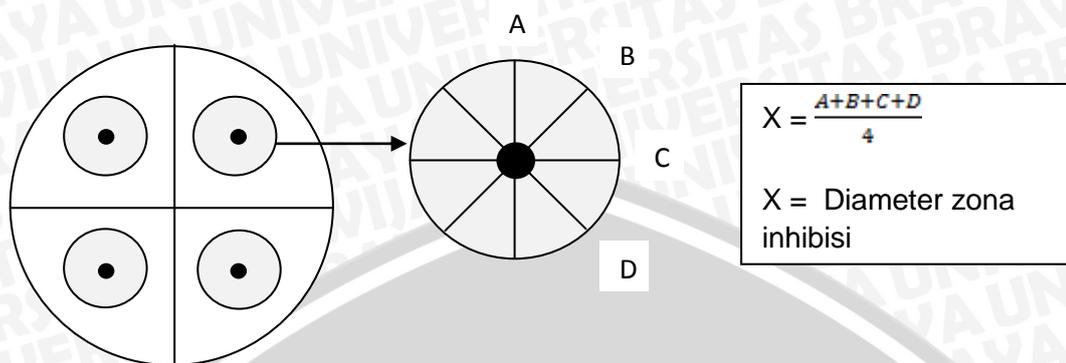
Disiapkan empat cawan petri yang berisi *Enterococcus faecalis* dalam media MHA dengan bahan uji 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ekstrak daun ketepeng cina, kontrol kuman berupa akuades, dan pembanding yaitu klorheksidin 2% dengan tahapan sebagai berikut :

1. Ambil bakteri sebanyak 1 ml dengan menggunakan mikropipet kemudian dituangkan pada cawan petri yang berisi MHA sebanyak 14 ml dan plate diputar secara perlahan agar bakteri dan media menjadi homogen .
2. Setelah suspensi bakteri dan media *setting*, pada setiap cawan petri dibuat 4 lubang sumuran dengan diameter 5 mm menggunakan perforator.

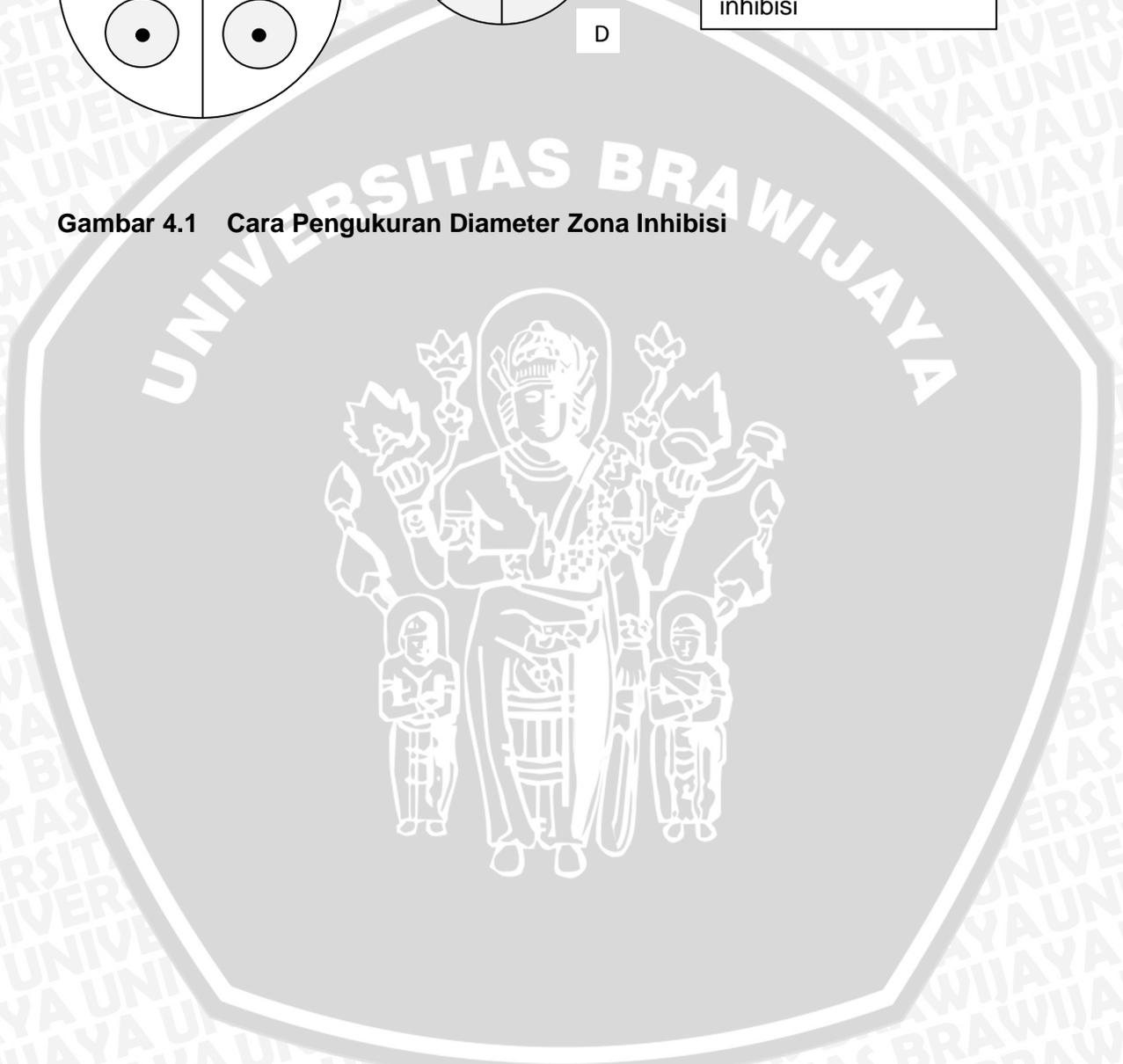
3. Masing-masing lubang sumuran pada cawan petri dengan satu konsentrasi sehingga mewakili 4 pengulangan dan masing-masing diberi label. Cawan petri pertama berisi 40 μ l akuades sebagai kontrol kuman, cawan petri kedua berisi larutan ekstrak etanol daun ketepeng cina dengan konsentrasi 50%, cawan petri ketiga berisi konsentrasi 60%, cawan petri keempat berisi konsentrasi 70%, cawan petri kelima berisi konsentrasi 80%, cawan petri keenam berisi konsentrasi 90%, cawan petri ketujuh berisi konsentrasi 100%, dan cawan petri kedelapan klorheksidin 2%.
4. Setelah semua lubang berisi larutan, cawan petri dimasukkan kedalam inkubator dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
5. 24 jam setelah dilakukan inkubasi, zona inhibisi yang terbentuk dapat diukur dengan menggunakan jangka sorong.

4.7.5 Pengamatan dan Pengukuran

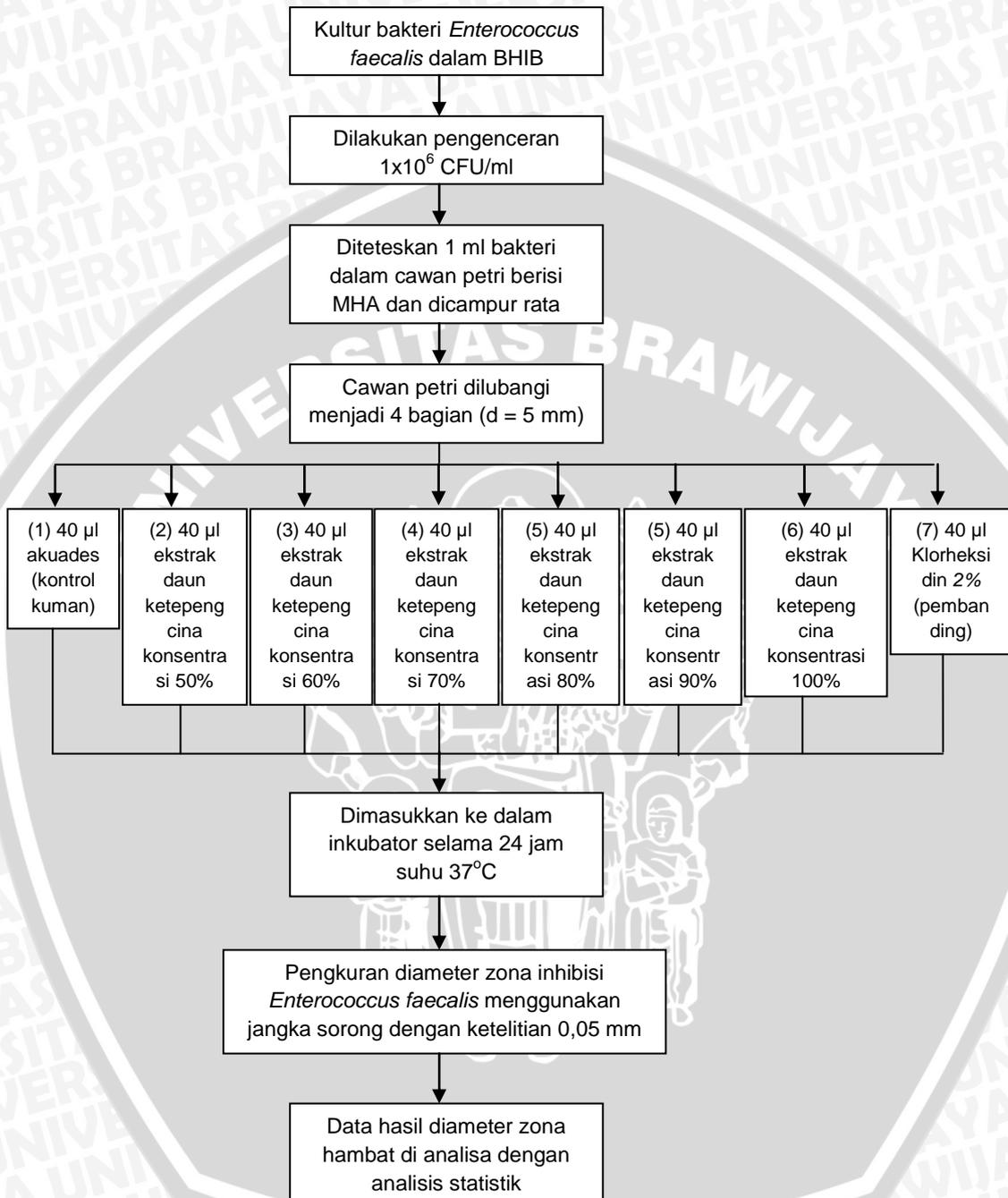
Larutan yang diletakkan di dalam sumuran akan memberikan suatu zona bebas bakteri mengelilingi daerah sumuran dimana luasnya zona berbanding lurus pada kekuatan sampel dalam menghambat bakteri. Zona inhibisi yang dihasilkan mempunyai bentuk lingkaran dan diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 satuan milimeter (mm). Pengukuran diameter zona inhibisi dilakukan sebanyak 4 kali (arah vertikal, horizontal, dan dua arah diagonal) dan dihitung rata-ratanya. Diameter diukur dari batas terluar dari zona inhibisi dari satu sisi ke sisi lainnya.



Gambar 4.1 Cara Pengukuran Diameter Zona Inhibisi



4.8 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 4.2 Skema Prosedur Penelitian

4.9 Skema Data Hasil Penelitian

Tabel 4.1 Skema Data Hasil Penelitian Efek Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina

Pengulangan	KK (0%)	50%	60%	70%	80%	90%	100%	Pembanding (Klorheksidin 2%)
1	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm
2	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm
3	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm
4	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm	... mm

4.10 Analisis Data

Data hasil pengujian anti mikroba dianalisis dengan memakai uji statistik sebagai berikut (Nisbet *et al.*, 2009):

1. Uji Normalitas *Kolmogorov-Smirnov* (Uji K-S) untuk mendeteksi normalitas dari suatu data.
2. Uji Homogenitas (*Levene*) untuk mengetahui kesamaan atau homogenitas varian dari beberapa populasi.

Apabila hasil menunjukkan data berdistribusi normal dan homogen, maka dapat dilakukan uji komparasi, korelasi, dan regresi dengan menggunakan uji sebagai berikut:

1. Uji analisis varian satu arah (ANOVA), untuk melihat perbedaan efek antimikroba ekstrak etanol daun ketepeng cina terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis*.

2. Uji *Post Hoc Tukey Test*, untuk membandingkan perbedaan antara pemberian dua konsentrasi ekstrak etanol daun ketepeng cina.
3. Uji korelasi (*Pearson*) untuk mengetahui hubungan jumlah konsentrasi ekstrak etanol daun ketepeng cina dengan pertumbuhan *Enterococcus faecalis*.
4. Uji regresi untuk mengetahui besarnya hubungan dari efek antimikroba ekstrak etanol daun ketepeng cina dengan pertumbuhan *Enterococcus faecalis*.

Apabila hasil menunjukkan data berdistribusi tidak normal atau tidak homogen, maka dilakukan uji komparasi, korelasi, dan regresi dengan menggunakan uji sebagai berikut:

1. Uji Komparasi *Kruskal-Wallis* kemudian dilanjutkan uji *Post Hoc Mann Whitney* untuk melihat perbedaan efek antimikroba ekstrak etanol daun ketepeng cina terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis*.
2. Uji korelasi (*Spearman*) untuk mengetahui hubungan jumlah konsentrasi ekstrak etanol daun ketepeng cina dengan pertumbuhan *Enterococcus faecalis*.
3. Uji regresi untuk mengetahui besarnya hubungan dari efek antimikroba ekstrak etanol daun ketepeng cina dengan pertumbuhan *Enterococcus faecalis*.