

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik. Uji antibakteri dengan menggunakan *tube dilution test* untuk mengetahui aktivitas ekstrak lada hitam (*Piper nigrum*) sebagai antibakteri terhadap *S. Typhi*. Proses pengekstrakan lada hitam menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Sedangkan pengujian ekstrak lada hitam sebagai antibakteri menggunakan metode dilusi tabung. *Tube dilution test* meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada media *broth* dan tahap penanaman pada medium NAP (*Nutrient Agar Plate*) dengan metode *streaking* (penggoresan) yang bertujuan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum). Besarnya konsentrasi yang digunakan, ditetapkan melalui eksperimen pendahuluan.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Uji antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juli - September 2015. Tempat ekstraksi lada hitam di UPT Materia Medica jalan Lahor No.87, Kota Batu.

4.3 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini, digunakan 6 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda serta 1 kontrol positif tidak ikut untuk perhitungan, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus (Loekito, 1998).

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 21/6$$

$$n \geq 3,5 \rightarrow n = 4$$

Jadi pada penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak empat kali, masing-masing sampel berjumlah 10^6 CFU/ml.

keterangan : n = jumlah pengulangan.

p = jumlah perlakuan (konsentrasi ekstrak lada hitam).

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak lada hitam yang dibuat dengan konsentrasi kadar ekstrak antara lain : 0% , 22,5% , 25% , 27,5%, 30%, dan 32,5% berdasarkan eksplorasi awal atau penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kekeruhan yang dapat diamati pada tabung dan jumlah koloni bakteri *S. Typhi* yang tumbuh pada medium NAP.

4.5 Definisi Operasional

- 1) Lada hitam (*Piper nigrum*) yang digunakan adalah biji lada hitam yang dibeli dari toko di Pasar Belimbing Malang.
- 2) Ekstrak lada hitam didapatkan dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi terhadap lada hitam kering, kemudian dilakukan penyaringan, dilarutkan menggunakan pelarut *etanol* 96% dan penguapan dengan *rotary-evaporator*.
- 3) Bakteri *S. Typhi* berjumlah satu isolat yang diperoleh dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat-alat dan bahan untuk pembuatan ekstrak etanol lada hitam

Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak lada hitam adalah oven, timbangan, gelas erlenmeyer, corong gelas, kertas saring, labu evaporator, labu penampang *ethanol*, pendingin spiral/*rotator evaporator*, selang water pump, water pump, water bath, vacuum pump.

Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak lada hitam adalah lada hitam, aquades, ethanol 96%.

4.6.2 Alat dan bahan untuk pewarnaan Gram

Alat-alat yang digunakan untuk pewarnaan Gram adalah gelas objek, kertas penghisap, mikroskop, ose.

Bahan yang digunakan untuk pewarnaan Gram Bakteri adalah bakteri *S. Typhi*, lugol, kristal violet, alkohol 96%, sarfanin, air.

4.6.3 Alat dan bahan untuk uji dilusi tabung

Alat dan bahan untuk uji dilusi tabung adalah tabung reaksi, pipet steril ukuran 1 ml, karet penghisap, inkubator, ekstrak lada hitam, vortex, pembenihan cairan yang distandarisasikan (NaCl, broth), BSA, bunsen (lampu spritus), korek, gelas objek, plate kosong dan steril, kapas, alat penjepit (scalpel) steril, colony counter.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Lada Hitam

Ekstraksi lada hitam dilakukan oleh Balai Materia Medika Kota Batu. Secara singkat, proses pembuatan ekstrak lada hitam adalah sebagai berikut. Lada hitam dikeringkan kemudian dihaluskan. Masukkan lada hitam halus ke dalam gelas erlenmeyer lalu direndam dengan *etanol* 96% sampai volume 1000cc. Kocok sampai benar-benar tercampur kurang lebih 30 menit dan diamkan 1 malam sampai mengendap. Lapisan paling atas dipisahkan ke dalam gelas ekstraksi kemudian di evaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator*. *Rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan. Pemanas aquades dinyalakan juga sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi ikut mendidih dan pelarut *etanol* mulai menguap. Hasil penguapan *etanol* akan dikondensasikan menuju labu penampung *etanol* sehingga tercampur dengan hasil evaporasi, sedangkan uap lain tersedot pompa

vakum. Setelah kental maka proses evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Setelah evaporasi selesai, ekstrak dioven kembali dengan suhu 78°C selama 2 jam karena titik didih *etanol* adalah 78°C. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa *etanol* 96% yang mungkin masih tersisa dalam ekstrak.

4.7.2 Identifikasi Bakteri *Salmonella Typhi*

Sebelum digunakan untuk penelitian, isolat *S. Typhi* yang diperoleh diidentifikasi ulang dengan beberapa metode identifikasi antara lain: perwarnaan Gram, kultur pada medium BSA, dan uji microbact 12.

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Langkah-langkah melakukan pewarnaan Gram adalah sebagai berikut :

- 1) Bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak. Kemudian biarkan dingin.
- 2) 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.
- 3) Sediaan dituangi dengan Kristal Violet. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
- 4) Kemudian sediaan dituangi dengan Lugol. Setelah 1 menit, sediaan di bilas dengan air.
- 5) Sediaan dituangi dengan alkohol 96%. Setelah 5-10 detik, sediaan dibilas dengan air.

- 6) Sediaan dituangi dengan Safranin. Setelah setengah menit, sediaan dibilas dengan air.
- 7) Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan obyek perbesaran 100x. (Dzen et al, 2010).
- 8) *S. Typhi* berbentuk batang dan berwarna merah (bersifat Gram negatif).

4.7.2.2 Kultur pada Medium BSA (*Bismuth Sulfite Agar*)

Penamaan bakteri pada *Bismuth Sulfite Agar* (BSA) merupakan media selektif terhadap pertumbuhan *S. Typhi*. Penamaan bakteri pada media tersebut didapatkan gambaran *Black Jet Colony* (terbentuknya koloni hitam) yang merupakan gambaran khas dari *S. Typhi* (Vaishnavi, 2013). Prosedur identifikasi bakteri pada medium BSA:

- 1) Dilakukan inokulasi pada bakteri *S. Typhi* dengan metode streaking pada medium Bismuth Sulfite Agar (BSA).
- 2) Sediaan di inkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya.
- 3) Koloni bakteri *S. Typhi* pada medium BSA menghasilkan gambar *black jet colony* (koloni berwarna hitam).

4.7.2.3 Uji Identifikasi Bakteri dengan *Microbact 12*

Kit Microbact mencakup miniatur tes biokimia 12 (12A, 12B, dan 12E) atau 24 (24E). Tes *Kit Microbact* 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. Prosedur tes *Kit Microbact* antara lain (oxid, 2003) :

- 1) Menentukan hasil tes oksidase bakteri yang akan diuji untuk menentukan set *Microbact* yang akan digunakan.
- 2) Menginkubasi koloni bakteri selama 18-24 jam
- 3) Mengambil koloni menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 3-6ml garam fisiologis pada tabung reaksi steril hingga homogen.
- 4) Membuka penutup lubang *microplate*. Memasukan \pm 4 tetes suspensi bakteri ke dalam masing-masing lubang plate.
- 5) Memasukan \pm 2 tetes *mineral oil* (MB1093A) ke dalam lubang plat hitam.
- 6) Menutup kembali semua lubang plate, kemudian inkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- 7) Mengeluarkan *microplate* dari inkubator, kemudian menambahkan reagen yang diperlukan.

Hasil uji *Microbact* dapat diinterpretasikan menggunakan program tertentu yang telah disertakan dalam paket *Microbact*. Pada tes ini, *S.Typhi* akan memberikan hasil positif pada lysin, ornitin, glukosa, H₂S, manitol, xylose, dan citrat. Test *microbact* 12A memberikan hasil negatif pada ONPG, indole, urease, voges-proskauer serta TDA.

4.7.3 Prosedur Penelitian

4.7.3.1 Preparasi Bakteri Uji (10^8 CFU/mL)

- 1) Ambil koloni *S. Typhi* dengan karakteristik sama dari media BSA (*Bismuth Sulfite Agar*) dengan menggunakan ose.
- 2) Masukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi nutrient broth, kemudian inkubasikan tabung reaksi dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.
- 3) Lakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625nm, untuk mengetahui *optical density* (OD) dari suspensi tersebut.
- 4) 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 (10mL)

- 5) Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 /mL sebanyak 10mL.
- 6) Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 /mL sebanyak 10mL, dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan

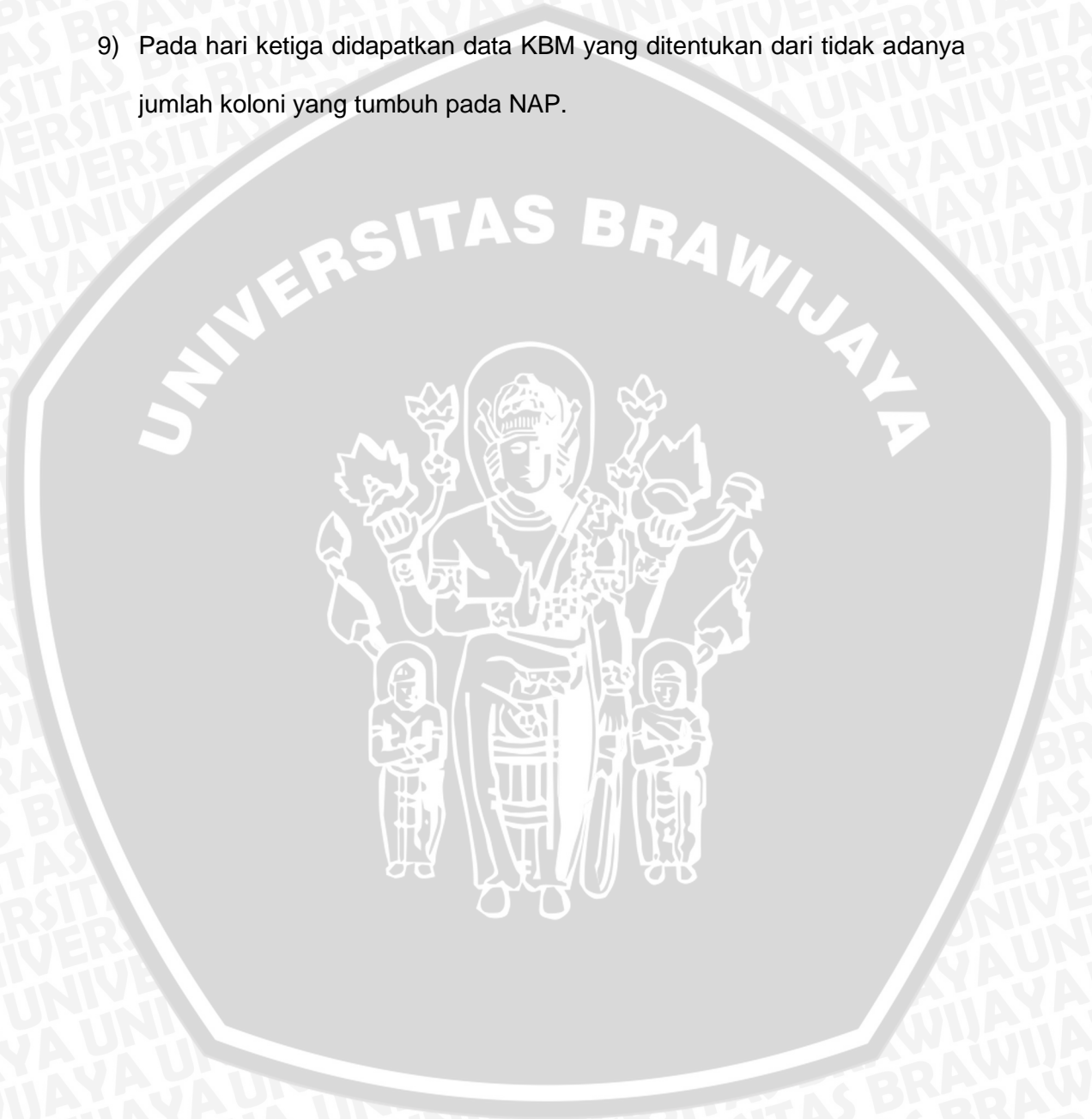
menggunakan NaCl dan *nutrient broth*, sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 /mL. Kini bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

4.7.3.2 Pengujian Efek Antimikroba

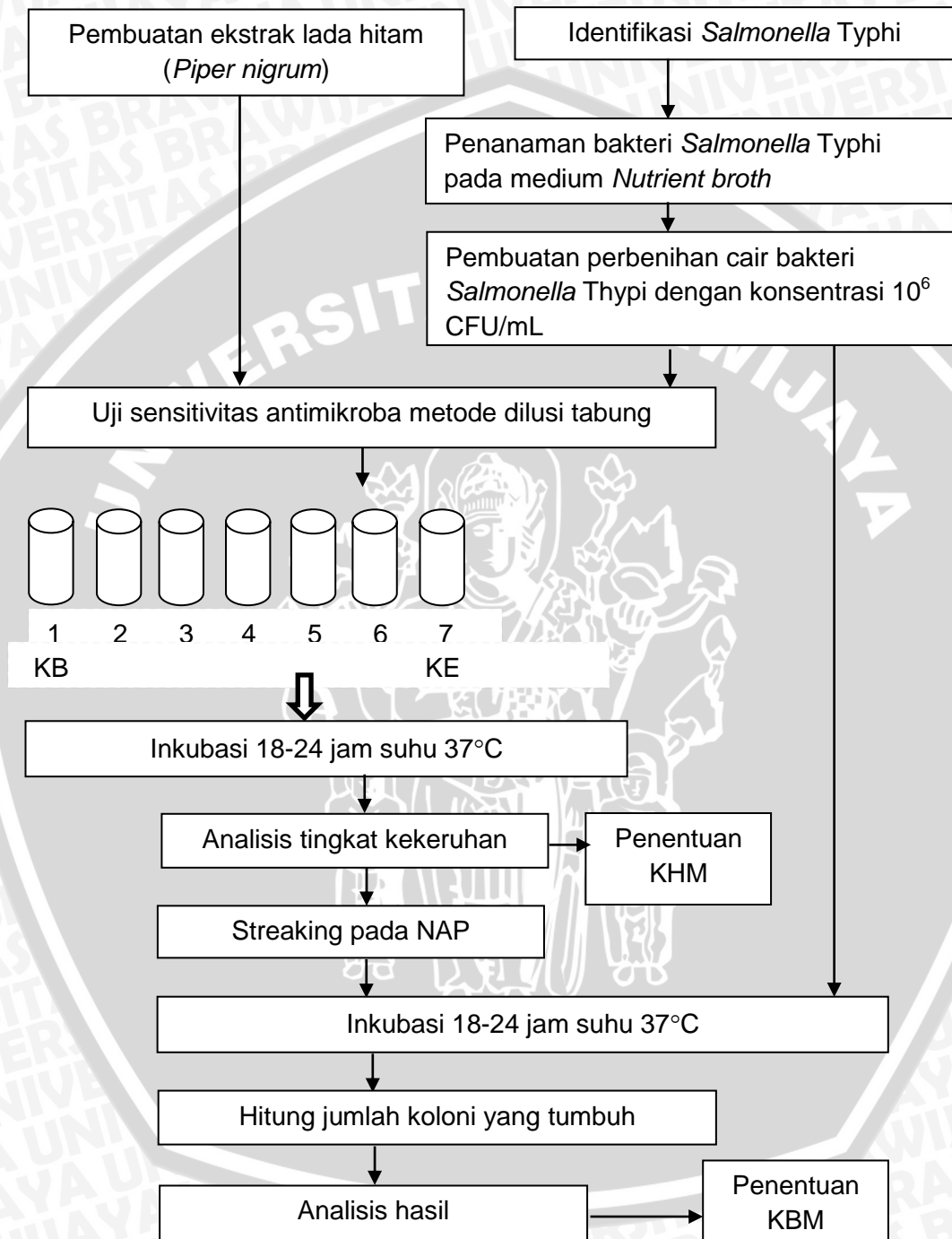
Rangkaian uji efektivitas antibakteri ekstrak lada hitam adalah sebagai berikut:

- 1) Ekstrak lada hitam disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit agar larutan ekstrak menjadi homogen dan tidak mengendap. Untuk perlakuan yang diambil adalah larutannya.
- 2) Sediakan 7 tabung reaksi steril kemudian diberi label 0%, 22,5%, 25%, 27,5%, 30%, 32,5%, dan KE (Kontrol Ekstrak). Kontrol Ekstrak adalah ekstrak. Konsentrasi ekstrak 0% adalah biakan bakteri *Salmonella Typhi* dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL.
- 3) Tabung reaksi 1 diisi dengan 2 mL suspensi bakteri.
- 4) Tabung 2, 3, 4, 5, dan 6 diisi dengan aquades steril sebanyak 0,775 mL; 0,750 mL; 0,725 mL; 0,7 mL; dan 0,675 mL kemudian diisikan dengan ekstrak lada hitam sebanyak 0,225 mL; 0,250 mL; 0,275 mL; 0,3 mL; dan 0,325 mL.
- 5) Selanjutnya ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 1 ml pada tabung 2-7 sedangkan pada tabung 7 sebagai kontrol bahan ditambahkan 2ml ekstrak lada hitam.
- 6) Masing-masing tabung di-*vortex* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C .
- 7) Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung.

- 8) Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada NAP. Kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C.
- 9) Pada hari ketiga didapatkan data KBM yang ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada NAP.



4.8 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

4.9 Analisis Data

Analisis data menggunakan uji statistic *one way ANOVA*, pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Uji statistic ini digunakan untuk mengetahui apakah ada perbedaan antara konsentrasi ekstrak lada hitam terhadap jumlah koloni bakteri *S. Typhi*. Selain itu juga digunakan uji korelasi-regresi untuk mengetahui hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak lada hitam terhadap jumlah koloni bakteri *S. Typhi*.

