

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah *true experimental design* dengan *post test only control group design*. Dalam penelitian ini dilakukan uji laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan efek antimikroba dari ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *S. Typhi* secara *in vitro*. Adapun uji kepekaan antimikroba yang dipakai untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah metode dilusi agar.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian uji antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juni – Agustus 2016.

4.3 Sampel dan Jumlah Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *S. Typhi* yang diperoleh dari stok kultur di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Rumus untuk menghitung estimasi jumlah sampel :

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

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel yang diperlukan

(Notobroto, 2005)

Penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi dari ekstrak etanol daun sirsak dan 1 kontrol bakteri ($p = 5 + 1 = 6$), sehingga didapatkan jumlah sampel

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 4 isolat bakteri *S. Typhi*.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas (*Independent variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak yaitu 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%. Penentuan konsentrasi ekstrak berdasarkan penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variabel Terikat (*Dependent variable*)

Variable terikat dalam penelitian ini adalah tingkat pertumbuhan bakteri *S. Typhi* untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM).

4.5 Definisi Operasional

- 1) Daun sirsak yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari UPT Materia Medica kota Batu, Malang.

- 2) Sediaan ekstrak etanol daun sirsak yang digunakan adalah daun sirsak yang sudah dikeringkan dan dihaluskan, kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi di Politeknik Negeri Malang.
- 3) Bakteri *S. Typhi* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari stok kultur yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Bakteri tersebut berasal dari spesimen darah keempat pasien yang terinfeksi *S. Typhi* (Isolat kode A, B, C, dan D).
- 4) Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar terendah atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol daun sirsak yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *S. Typhi* yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni (skoring 0).
- 5) Jumlah koloni *S. Typhi* yang tumbuh dinyatakan dalam bentuk skoring, yaitu 4, 3, 2, 1, 0. Skor 4 adalah koloni tumbuh sangat tebal dan tidak terhitung, 3 adalah koloni tumbuh tebal dan tidak terhitung, 2 adalah koloni tumbuh sedang dan tidak terhitung, 1 adalah koloni tumbuh tipis dan tidak terhitung, serta 0 adalah tidak ada pertumbuhan koloni.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Alat – alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol daun sirsak adalah oven, mortar dan pestle, timbangan / neraca, gelas erlenmeyer, coronggelas, kertas saring, labu evaporator, labu penampung etanol dan *Rotary evaporator vacum*.

Bahan untuk pembuatan ekstrak etanol daun sirsak adalah daun sirsak, etanol 70%, dan aquades.

4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri *Salmonella Typhi*

Alat – alat yang digunakan untuk identifikasi bakteri adalah ose, vortex, object glass, korek api, pembakar bunsen, kertas penghisap, mikroskop, inkubator, tabung reaksi, dan plate kosong steril.

Bahan untuk identifikasi bakteri *S. Typhi* adalah isolat bakteri *S. Typhi*, kertas oksidase, bahan pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), minyak emersi, MCA (*Mac Conkey Agar*), dan BSA (*Bismuth Sulfite Agar*).

4.6.3 Alat dan Bahan Uji Dilusi Agar

Alat – alat yang digunakan untuk uji dilusi agar adalah plate kosong steril, vortex, ose, mikropipet steril ukuran 10 µl, pembakar bunsen, korek api, penggaris, spidol permanen, dan inkubator.

Bahan untuk uji dilusi agar adalah ekstrak etanol daun sirsak, isolat bakteri *S. Typhi*, dan MHA (*Muller Hinton Agar*).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirsak

- 1) Daun sirsak dicuci hingga bersih menggunakan air, lalu dikeringkan di bawah sinar matahari. Kemudian daun sirsak dimasukkan oven suhu 60°C hingga kering.

- 2) Daun sirsak yang telah kering dihaluskan sampai menjadi serbuk.
- 3) Serbuk daun sirsak ditimbang sebanyak 300 g, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer.
- 4) Serbuk daun sirsak direndam dengan etanol 70% selama 48 jam dalam wadah tertutup.
- 5) Hasil rendaman kemudian disaring menggunakan kertas saring.
- 6) Ampas yang telah tersaring direndam lagi dengan pelarut etanol 70% selama 24 jam.
- 7) Hasil rendaman kemudian disaring kembali menggunakan kertas saring.
- 8) Semua hasil rendaman yang diperoleh lalu dipekatkan dengan mesin evaporator dengan suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$, kemudian dioven untuk menghilangkan pelarut etanol.
- 9) Hasil evaporasi berupa cairan kental. Dalam penelitian ini, konsentrasi ekstrak yang diperoleh dianggap 100%.

4.7.2 Identifikasi Bakteri *Salmonella Typhi*

Dilakukan pemurnian bakteri terlebih dahulu dengan menanam bakteri *S. Typhi* pada medium NAP (*Nutrient Agar Plate*), kemudian diinkubasi dalam mesin inkubator selama 18 – 24 jam dengan suhu 37°C .

1) Pewarnaan Gram

Prosedur pewarnaan Gram (Forbes *et al.*, 2007) :

- a. Buat sediaan apusan bakteri pada *object glass* dengan cara mengambil satu ose aquades steril diteteskan pada *object glass*, lalu diambil sedikit bakteri untuk disuspensikan dengan aquades pada *object glass*, kemudian dibiarkan kering di udara.

- b. Suspensi bakteri yang telah kering difiksasi dengan cara melewatkannya di atas api bunsen beberapa kali, kemudian sediaan siap untuk diwarnai.
- c. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama 1 menit, kemudian sisa kristal violet dibuang dan bilas dengan air.
- d. Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama 1 menit, kemudian sisa lugol dibuang dan bilas dengan air.
- e. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% dan ditunggu selama 5 – 10 detik atau sampai warna cat luntur, kemudian sisa alkohol dibuang dan bilas dengan air.
- f. Sediaan ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama 5 menit, kemudian sisa safranin dibuang dan bilas dengan air.
- g. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap lalu ditetesi dengan minyak emersi, kemudian amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Pada *S. Typhi* akan tampak bakteri berwarna merah (Gram negatif) dan berbentuk batang.

2) Tes Oksidase

Prosedur tes oksidase (Forbes *et al.*, 2007) :

- a. Kertas filter dibasahi dengan larutan reagen *tetramethyl p-phenylenediamine dihydrochloride* 1%.
- b. Koloni bakteri yang diperiksa digoreskan dengan ose pada kertas filter.
- c. Tes positif apabila warna goresan tersebut menjadi ungu sampai hitam dalam waktu $\frac{1}{2}$ - 1 menit.

Pada *S. Typhi*, hasilnya adalah oksidase negatif sebab tergolong keluarga *enterobacteriaceae*.

3) Penanaman Bakteri Pada Medium MCA (*Mac Conkey Agar*)

Prosedur penanaman bakteri pada medium MCA (Forbes *et al.*, 2007) :

- a. Menyiapkan medium Mac Conkey sehari sebelum digunakan dan menyimpannya di tempat yang gelap pada suhu ruangan.
- b. Mengambil bakteri dari perbenihan sebanyak 1 ose.
- c. Menggosokkan bakteri tersebut pada medium Mac Conkey.
- d. Biakan bakteri dalam medium Mac Conkey diinkubasi selama 18 – 24 jam dengan suhu 37°C.

Pada *S. Typhi*, medium Mac Conkey menunjukkan koloni tidak berwarna sebab bakteri *S. Typhi* tergolong *non-lactose fermenter bacteria*.

4) Penanaman Bakteri Pada Medium BSA (*Bismuth Sulfit Agar*)

Prosedur penanaman bakteri pada medium BSA (Forbes *et al.*, 2007) :

- a. Menyiapkan medium BSA sehari sebelum digunakan dan menyimpannya di tempat yang gelap pada suhu ruangan.
- b. Mengambil bakteri dari perbenihan sebanyak 1 ose.
- c. Menggosokkan bakteri tersebut pada medium BSA.
- d. Biakan bakteri dalam medium BSA diinkubasi selama 18 – 24 jam dengan suhu 37°C.

Pada *S. Typhi*, pertumbuhan bakteri akan menunjukkan koloni khas berwarna hitam (*black jet colony*).

4.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri 10^6 CFU/mL

- a. Beberapa koloni bakteri *S. Typhi* dari NAP (*Nutrient Agar Plate*) dipindahkan ke dalam tabung yang berisi *nutrient broth* menggunakan ose.
- b. Tabung reaksi lalu diinkubasi dalam mesin inkubator pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam.
- c. Kemudian dilakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui *optical density* (OD) dari suspensi. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/mL yang setara dengan OD = 0,1 (Murray *et al.*, 2007), maka dilakukan perhitungan sebagai berikut :

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Keterangan :

N1 : Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V1 : Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N2 : OD = 0,1 setara dengan 10^8 CFU/mL

V2 : Volume suspensi bakteri uji yang sudah diencerkan

- d. Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL sebanyak 10 mL.
- e. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL sebanyak 10 mL, selanjutnya dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan NaCl sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/mL.
- f. 1 mL kultur dari konsentrasi bakteri 10^8 CFU/mL ditambahkan ke dalam 9 ml NaCl untuk mendapatkan konsentrasi bakteri 10^7 CFU/mL.

- g. Lalu proses pengenceran diulang lagi dengan menambahkan 1 mL kultur dari konsentrasi bakteri 10^7 CFU/mL ke dalam 9 mL NaCl untuk mendapatkan pengenceran akhir yang mengandung konsentrasi bakteri 10^6 CFU/mL.
- h. Konsentrasi bakteri 10^6 CFU/mL tersebut yang digunakan dalam penelitian.

4.7.4 Penelitian Pendahuluan

Untuk menentukan konsentrasi ekstrak yang akan digunakan pada penelitian yang sebenarnya, terlebih dahulu dilakukan penelitian pendahuluan untuk membuktikan sensitivitas bakteri *S. Typhi* terhadap ekstrak etanol daun sirsak secara *in vitro*. Adapun konsentrasi ekstrak yang dipakai pada penelitian pendahuluan dimulai dari 5%, 4%, 3%, 2%, dan 1%. Dari penelitian pendahuluan tersebut tidak didapatkan adanya pertumbuhan koloni bakteri *S. Typhi* pada konsentrasi manapun. Selanjutnya konsentrasi ekstrak diperkecil hingga ditemukan perkiraan konsentrasi yang representatif yaitu 1%, 0,8%, 0,6%, 0,4%, dan 0,2%.

4.7.5 Uji Dilusi Agar

Pada penelitian ini, uji efek antimikroba yang digunakan adalah metode uji dilusi agar, sebab ekstrak etanol daun sirsak berwarna pekat, keruh dan menggumpal, sehingga akan mengganggu visualisasi apabila menggunakan metode dilusi tabung. Uji dilusi agar dapat digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal).

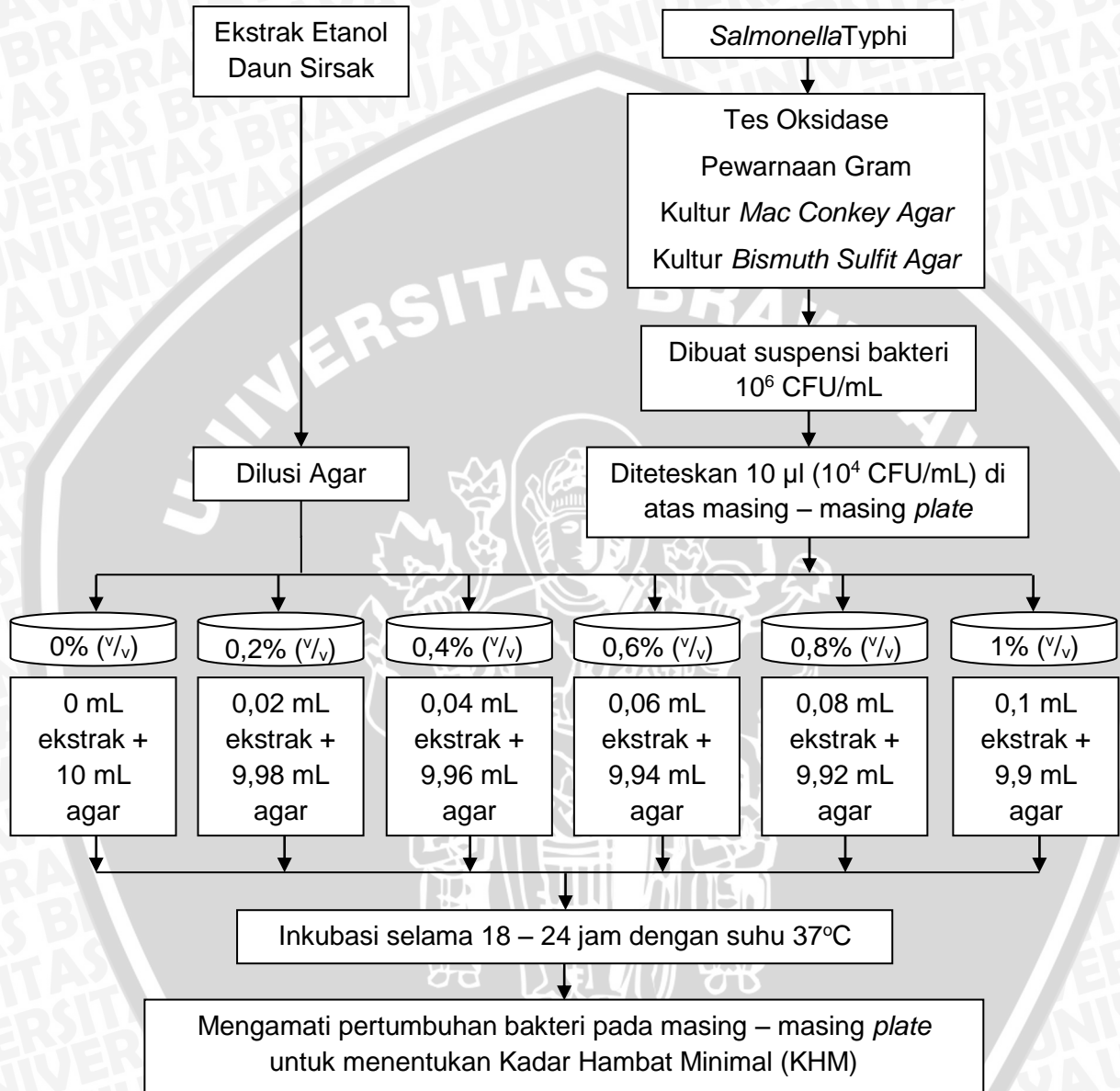
Prosedur uji dilusi agar :

- 1) Medium *nutrient agar* disterilkan dengan *autoclaf* (120°C selama 15 menit).
- 2) Menyiapkan 6 *plate* steril berdiameter 10 cm, kemudian diberi tanda berdasarkan presentase konsentrasi ekstrak, yaitu 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, dan 1%.
- 3) Masing – masing *plate* diisi dengan larutan ekstrak etanol daun sirsak dengan konsentrasi 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, dan 1%, kemudian dicampur dengan *nutrient agar* yang sebelumnya telah disterilisasi sebelumnya.
- 4) Volume yang dipakai dalam setiap *plate* adalah 10 mL. Sehingga perhitungannya sebagai berikut :
Konsentrasi 0% (v/v) : tanpa ekstrak + 10 mL *nutrient agar* steril yang masih cair
Konsentrasi 0,2% (v/v) : 0,02 mL ekstrak etanol daun sirsak + 9,98 mL *nutrient agar* steril yang masih cair
Konsentrasi 0,4% (v/v) : 0,04 mL ekstrak etanol daun sirsak + 9,96 mL *nutrient agar* steril yang masih cair
Konsentrasi 0,6% (v/v) : 0,06 mL ekstrak etanol daun sirsak + 9,94 mL *nutrient agar* steril yang masih cair
Konsentrasi 0,8% (v/v) : 0,08 mL ekstrak etanol daun sirsak + 9,92 mL *nutrient agar* steril yang masih cair
Konsentrasi 1% (v/v) : 0,1 mL ekstrak etanol daun sirsak + 9,9 mL *nutrient agar* steril yang masih cair

Kemudian semua *plate* diinkubasi dalam mesin inkubator pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam.

- 5) Menyiapkan bakteri uji yang sebelumnya telah diencerkan menjadi 10^6 CFU/mL.
- 6) Semua *plate* dibagi menjadi 4 bagian sama rata untuk masing – masing 4 isolat, sebab dalam penelitian ini menggunakan 4 pengulangan yang sama dengan 4 isolat bakteri.
- 7) Kemudian 4 bagian *plate* tersebut akan ditetesi dengan 4 isolat bakteri uji yang berbeda – beda, masing – masing sebanyak 10 μ l (10^4 CFU/mL). Kemudian semua *plate* diinkubasi dalam mesin inkubator pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam.
- 8) Koloni yang tumbuh pada *agar plate* diamati. *Plate* dengan konsentrasi terendah dimana sudah tidak didapatkan pertumbuhan bakteri adalah *plate* dengan konsentrasi yang dapat disebut sebagai Kadar Hambat Minimal.

4.7.6 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian

4.8 Analisis Data

Data hasil penelitian ini adalah data kualitatif yang telah dikuantitatifkan dengan skoring (berskala ordinal) dari hasil pertumbuhan bakteri *S. Typhi* pada *agar plate* yang telah diinkubasi selama 18 – 24 jam dengan suhu 37°C. Analisis yang digunakan adalah uji statistik Kruskal Wallis, uji Mann Whitney, dan uji korelasi Spearman. Dengan menggunakan uji Kruskal Wallis, maka dapat diketahui apakah ada perbedaan pengaruh dari konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak terhadap pertumbuhan bakteri *S. Typhi*. Uji Mann Whitney dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak yang menunjukkan perbedaan signifikan. Uji statistik korelasi Spearman digunakan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak terhadap pertumbuhan bakteri *S. Typhi* secara *in vitro*. Dalam penelitian ini, tingkat kepercayaan yang dipakai adalah 95% ($\alpha = 0,05$).

