

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post test only control group*. Uji aktivitas antimikroba ini diharapkan dapat memperlihatkan konsentrasi ekstrak etanol kelopak rosella yang dapat mempengaruhi pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro* dengan metode difusi sumuran.

4.2 Sampel dan Estimasi Jumlah Pengulangan

Penelitian ini menggunakan sampel berupa spesimen bakteri *Streptococcus pyogenes* yang terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini menggunakan 5 (lima) macam konsentrasi yang berbeda dari ekstrak etanol kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dan konsentrasi 0% sebagai kontrol positif. Perhitungan jumlah pengulangan pada sampel menggunakan rumus sebagai berikut.

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

n : jumlah sampel yang dibutuhkan

p : jumlah perlakuan yang dilakukan

Terdapat 6 (enam) macam perlakuan, maka:

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$n \geq 21/6$$

$n \geq 3,5$, dibulatkan ke atas menjadi 4 (empat).

Dengan demikian, diperlukan paling sedikit empat pengulangan untuk satu jenis perlakuan konsentrasi ekstrak etanol kelopak rosella.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah zona inhibisi yang dibentuk oleh ekstrak etanol kelopak rosella terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol kelopak rosella. Perlu dilaksanakan penelitian pendahuluan untuk menentukan konsentrasi ekstrak etanol kelopak rosella yang akan digunakan pada penelitian definitif.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian dilaksanakan pada November - Desember 2016. Bahan ekstraksi kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) diperoleh dari Zahra Agar Wood, Jakarta dan dideterminasi di UPT Materia Medika Kota Batu. Ekstraksi kelopak rosella dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Pembuatan Ekstrak Kelopak Rosella

a. Alat

Alat yang diperlukan untuk pembuatan ekstrak antara lain toples bertutup corong gelas, timbangan analitik, gelas ukur, botol, labu *Erlenmeyer*, *rotary evaporator*, *beaker glass*, *vacum pump*, *water pump*, kertas saring.

b. Bahan

Bahan yang diperlukan adalah kelopak rosella, *aquades*, dan etanol 96%.

4.5.2 Identifikasi Bakteri *Streptococcus pyogenes*

a. Alat

Alat yang diperlukan untuk identifikasi *Streptococcus pyogenes* antara lain gelas objek, mikroskop, ose, bunsen, pipet steril, inkubator, dan *petri dish*.

b. Bahan

Bahan yang diperlukan dalam identifikasi yaitu spesimen *Streptococcus pyogenes*, kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin, H₂O₂ 3% untuk uji katalase, *blood agar plate* (BAP), *bacitracin*, minyak emersi, spiritus, *aquades*, korek api, tisu atau kertas hisap.

4.5.4 Uji Aktivitas Antimikroba dengan Metode Difusi Sumuran

a. Alat

Alat yang diperlukan dalam uji antimikroba dengan metode difusi sumuran antara lain *Petri dish*, inkubator, *sterile cork borer*, jangka sorong.

b. Bahan

Bahan yang diperlukan dalam uji antimikroba dengan metode difusi sumuran antara lain ekstrak kelopak rosella dalam beberapa konsentrasi yang telah ditentukan, spesimen bakteri yang telah dipersiapkan untuk inokulasi, *Mueller Hinton Agar* (MHA).

4.6 Definisi Operasional

1. Kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) yang digunakan adalah kelopak berwarna hijau kemerahan. Kelopak yang dipilih adalah yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua.
2. Ekstrak etanol kelopak rosella didapatkan dengan metode ekstraksi maserasi terhadap kelopak rosella kering, kemudian dilakukan penyaringan dan penguapan dengan menggunakan *rotary-evaporator*.

3. Spesimen bakteri adalah *Streptococcus pyogenes* yang terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum penelitian dilaksanakan, dilakukan beberapa tes antara lain pewarnaan *Gram*, uji katalase, uji *Bacitracin* dan uji hemolisis.
4. Uji efektivitas antimikroba yang digunakan pada penelitian ini adalah difusi sumuran.
5. Zona inhibisi adalah luas area yang melingkar di sekitar sumur injeksi ekstrak antimikroba. Zona ini diukur dengan menggunakan jangka sorong pada keempat diameter. Satuan untuk zona inhibisi yang digunakan adalah milimeter (mm).
6. Kontrol positif adalah konsentrasi ekstrak etanol rosella 0% atau aquades.
7. Kelompok perlakuan adalah ekstrak etanol kelopak rosella dalam berbagai konsentrasi. Untuk penelitian pendahuluan digunakan konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Untuk penelitian definitif digunakan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Ekstraksi Kelopak Rosella

a. Proses Pengeringan

1. Kelopak rosella dicuci bersih
2. Kelopak rosella ditiriskan
3. Kelopak rosella lalu dikeringkan dengan panas tidak langsung sampai kering (bebas kandungan air).

b. Proses Ekstraksi

1. Setelah sampel dikeringkan, kemudian dihaluskan dengan blender

2. Bubuk kelopak rosella ditimbang dengan menggunakan timbangan sebanyak 200 gram yang diperoleh dari 2,5 kilogram kelopak rosella
3. Kemudian dibasahkan dengan pelarut etanol secukupnya di *beaker glass*
4. Serbuk kelopak rosella yang telah dibasahi dimasukkan ke toples 5 L tertutup. Diratakan dan ditambahkan pelarut etanol sampai serbuk terendam. Tutup toples dengan rapat selama 24 jam, dan *dishake* dengan kecepatan 50 rpm.
5. Ekstrak cair disaring dengan penyaring kain. Kemudian ekstrak ditampung dalam *Erlenmeyer*.
6. Ampas diremaserasi sebanyak dua kali dengan cara dimasukkan kembali kedalam toples dan ditambahkan dengan pelarut sampai terendam (minimal 5 cm diatas permukaan serbuk). Kemudian dibiarkan semalam di atas *shaker*. Masing-masing remaserasi menggunakan pelarut metanol sebanyak 1,5 L.

c. Proses Evaporasi

1. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* besar. Diperlukan waktu sekitar 1 jam untuk evaporasi.
2. Ekstrak cair yang dihasilkan kemudian dievaporasi/diuapkan kembali diatas *waterbath* selama 1 jam.
3. Hasil yang diperoleh merupakan ekstrak murni sebanyak 60 gram dengan konsentrasi 100%.

4.7.2 Identifikasi Bakteri *Streptococcus pyogenes*

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan *Gram* menurut Baron *et al.* (1994) adalah :

- a. Sediaan hapusan bakteri dibuat pada gelas obyek
- b. Sediaan hapusan digenangi dengan kristal violet selama 1 menit, kemudian sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air
- c. Sediaan hapusan digenangi lugol selama 60 detik, kemudian sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air
- d. Sediaan hapusan digenangi alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur kemudian sisa alkohol 96% dibuang dan dibilas dengan air
- e. Sediaan hapusan digenangi safranin selama 30 detik kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas air
- f. Sediaan hapusan dikeringkan menggunakan kertas penghisap
- g. Setelah kering, diamati dibawah mikroskop pada perbesaran total 1000x
- h. Bakteri *Streptococcus pyogenes* yang teramati di bawah mikroskop berupa bakteri kokus *Gram* positif.

4.7.2.2 Tes Katalase

- a. Gelas objek yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu, dengan menggunakan kapas dan dilewatkan diatas api
- b. Suspensi bakteri yang akan diuji diletakkan diatas gelas objek
- c. Larutan H₂O₂ 3% diteteskan ke suspensi bakteri kemudian ditunggu selama 5-10 detik.
- d. Hasil tes katalase positif apabila dihasilkan gelembung oksigen pada sediaan
- e. Hasil tes katalase negatif apabila tidak didapatkan gelembung
- f. Tes katalase digunakan untuk membedakan bakteri kokus gram positif: tes katalase positif menunjukkan bakteri *Staphylococcus*, sedangkan tes

katalase negatif menunjukkan bakteri *Streptococcus* atau *Enterococcus* (Reiner, 2010).

4.7.2.3 Uji Hemolisa

- Siapkan *Blood Agar Plate* (BAP)
- Ratakan spesimen bakteri dengan menggunakan ose
- BAP kemudian diinkubasi selama semalam pada suhu 37°C di 5% CO₂
- Perhatikan warna dari area pertumbuhan bakteri.

(Spellenberg dan Brandt, 2016)

4.7.2.4 Uji Kepekaan terhadap *Bacitracin*

- Siapkan BAP kemudian spesimen diratakan pada agar dengan menggunakan ose.
- Letakkan disk yang mengandung 0,04 U *bacitracin* di atas BAP
- BAP kemudian diinkubasi selama semalam pada suhu 37°C di 5% CO₂
- Zona inhibisi yang terlihat disekitar *disk* menunjukkan kepekaan

(Spellenberg dan Brandt, 2016)

4.7.3 Pembuatan Suspensi Uji Bakteri

- Bakteri diencerkan dengan mencampur satu ose bakteri *Streptococcus pyogenes* ke dalam tabung berisi *nutrient broth*.
- Ukur ODnya pada panjang gelombang 625 nm untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10⁸ CFU/ml yang setara dengan OD = 0,1. Untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10⁶ CFU/ml maka dilakukan penghitungan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

N1 = Konsentrasi bakteri yang dicari

V1 = Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengencer

N2 = OD (0,1 setara dengan 10^8 CFU/ml)

V2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

(Qudsi *et al.*, 2016)

4.7.4 Uji Aktivitas Antimikroba dengan Metode Difusi Sumuran

- a. Sediakan empat *petri dish* steril berdiameter 9 cm
- b. Suspensi bakteri dicampur dengan agar dalam *petri dish*.
- c. *Petri dish* dimasukkan ke dalam kulkas selama 15-20 menit.
- d. Agar kemudian dilubangi dengan diameter 5mm dengan *sterile cork borer*
- e. Konsentrasi ekstrak dimasukkan ke dalam lubang dengan ketentuan sebagai berikut:
 1. Lubang 1 : 0% ml ekstrak kelopak rosella
 2. Lubang 2 : 6,25% ml ekstrak kelopak rosella
 3. Lubang 3 : 12,5% ml ekstrak kelopak rosella
 4. Lubang 4 : 25% ml ekstrak kelopak rosella
 5. Lubang 5 : 50% ml ekstrak kelopak rose
 6. Lubang 6 : 100% ml ekstrak kelopak rosella
- f. *Petri dish* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator
- g. Ukur zona inhibisi menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm) pada empat diameter yang berbeda.

4.8 Analisis Data

Hasil penelitian akan dianalisis dengan menggunakan bantuan program *IBM SPSS Statistics 22*. Penelitian ini menggunakan dua variabel. Variabel

bebas berupa data ordinal dan variabel tergantung berupa data rasio. Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam analisa data adalah sebagai berikut.

1. Memeriksa syarat uji parametrik (*one way ANOVA*) meliputi uji asumsi data untuk normalitas dan homogenitas ragam data. Jika salah satu atau kedua asumsi tidak terpenuhi, maka uji parametrik (*One-Way ANOVA*) tidak boleh dilakukan dan digantikan dengan uji non-parametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis*.
2. Melakukan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui aktivitas antimikroba ekstrak etanol kelopak rosella terhadap *Streptococcus pyogenes* dilihat dari diameter zona inhibisi ekstrak.
3. Analisa data dilanjutkan dengan *Post Hoc Test (Tukey Test)* untuk melihat adanya perbedaan zona inhibisi yang lebih spesifik antar konsentrasi. Apabila data merupakan data non-parametrik, maka *Post Hoc Test* dilakukan dengan *Mann-Whitney*.
4. Uji korelasi, dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui hubungan antara ekstrak etanol kelopak rosella dengan pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*. Apabila data merupakan data parametrik, maka uji korelasi menggunakan *Pearson test*. Jika data merupakan data non-parametrik, maka dilakukan uji korelasi dengan *Spearman test*.