

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* di Laboratorium *in vitro* dengan rancangan *true experimental-post test only control group design*. Uji antimikroba ini dilakukan dengan menggunakan metode dilusi agar untuk mengetahui aktivitas ekstrak tanaman putri malu (*Mimosa pudica L*) sebagai antibakteri terhadap *Ps. aeruginosa*.

4.2. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri satu isolat *Ps. aeruginosa* yang berasal dari isolat pus kulit penderita, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya, Malang pada bulan April 2016- September 2016.

4.4 Estimasi Jumlah Pengulangan

Pada penelitian ini digunakan 6 macam konsentrasi perlakuan yang berbeda serta 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif, sehingga jumlah

pengulangannya yang dilakukan dalam penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus estimasi pengulangan (Loekito, 1998).

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

Keterangan : n= jumlah pengulangan

P= jumlah perlakuan

Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 6 macam konsentrasi (0%; 1%; 1,25 ; 1,5%; 1,75% dan 2% v/v) dari ekstrak tanaman putri malu, sehingga didapatkan jumlah pengulangan sampel sebagai berikut:

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

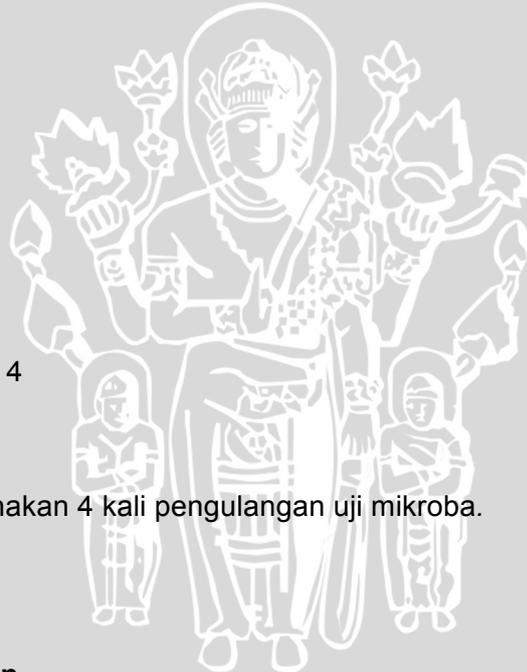
$$n \geq 3.5 \approx 4$$

Penelitian ini menggunakan 4 kali pengulangan uji mikroba.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah beberapa konsentrasi ekstrak tanaman putri malu, yaitu (0%; 1%; 1,25 ; 1,5%; 1,75% dan 2% v/v)



4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah pertumbuhan *Ps. aeruginosa* pada media agar padat.

4.6 Definisi Operasional

- 1) Isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu isolate pus kulit yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang yang berasal dari spesimen pus pasien dengan kode isolat 241-P.
- 2) Tanaman putri malu (*Mimosa pudica* L) yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun putri malu yang didapatkan dari UPT Materia Medika Batu, Malang.
- 3) Ekstrak tanaman putri malu didapat dengan cara ekstraksi metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Etanol dipilih karena etanol dapat menarik senyawa kimia aktif yang terdapat pada tanaman putri malu.
- 4) Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi larutan ekstrak daun putri malu terendah yang mampu mengganggu pertumbuhan koloni *Pseudomonas aeruginosa*, yang ditandai dengan tebal atau tidaknya jumlah koloni, dengan system skoring, yaitu: 4, 3, 2, 1, 0, yang berarti:
 - 4: koloni tumbuh tebal dan tidak terhitung
 - 3: koloni agak tebal dan tidak terhitung
 - 2: koloni tumbuh tipis dan tidak terhitung
 - 1: koloni tumbuh sangat tipis dan tidak terhitung
 - 0: tidak ada pertumbuhan (Hendriksen, 2003).

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat dan Bahan untuk Kultur Bakteri

4.7.1.1 Alat

Alat yang digunakan pada kultur bakteri adalah tabung reaksi, ose, lampu, spiritus atau Bunsen, inkubator, spektrofotometer dan korek api.

4.7.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada kultur bakteri adalah bakteri *Ps. aeruginosa*, *nutrient broth* (NB).

4.7.2 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram

4.7.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada pewarnaan Gram adalah object glass, kertas penghisap atau saring, minyak emersi, ose, mikroskop, lampu spiritus, bunsen, dan korek api.

4.7.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada pewarnaan Gram adalah kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin, Mc Conkey, cotton bud, larutan *tetremethyl-phenylane* oksidase 1% (reagen tes oksidase), dan isolate bakteri *Ps. aeruginosa* yang didapat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Bawijaya.

4.7.3 Alat untuk Pembuatan Ekstrak Putri Malu

4.7.3.1 Alat

Alat- alat yang digunakan untuk membuat ekstrak tanaman putri malu diantaranya blender, saringan serbuk, timbangan analitik, beaker glass, rotary evaporator, gelas ukur, Erlenmeyer, *digital shaker*, gelas ukur, corong.

4.7.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk membuat ekstrak putri malu antara lain serbuk tanaman putri malu, etanol 96%, dan aquades .

4.8 Operasional Penelitian

4.8.1 Persiapan Alat

Semua alat yang akan dipakai dalam penelitian ini distrilkan dalam streilisator panas kering selama 15 menit dengan suhu 110°C terlebih dahulu. Bahan media disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit dengan suhu 121°C.

4.8.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Putri Malu

Pembuatan ekstrak etanol tanaman putri malu dengan proses pengeringan dengan pembuatan proses ekstraksi dan evaporasi.

4.8.2.1 Proses Pengeringan

- 1) Tanaman putri malu dibersihkan dengan cara dibasuh dengan air mengalir.
- 2) Proses selanjutnya adalah memotong atau mengiris kecil- kecil tanaman putri malu, untuk mempercepat proses pengeringan.
- 3) Tanaman putri malu dikeringkan dengan cara dioven.

4.8.2.2 Proses Ekstraksi Tanaman Putri Malu

Menimbang serbuk daun putri malu sebanyak 500 gram, dibasahkan dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1000mL, dimasukkan serbuk yang telah dibasahi dengan pelarut etanol 96% sampai terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat atau lebih) dengan pelarut yang ditambahkan sebanyak 1000mL, tutup dengan toples rapat selama 24 jam, dishaker dengan digital shaker 500 rpm, kemudian disaring ekstrak cair dengan penyaring kain dan ditampung di Erlenmeyer. Ampas dimasukkan lagi dalam toples dan ditambahkan pelarut sampai terendam (minimal pelarut 5cm diatas permukaan), dibiarkan selama 24 jam diatas shaker, diremaserasi sampai filtrate atau ekstrak lebih jernih menggunakan 500 mL pelarut. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir, dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator perlu waktu 4 jam 30 menit. Ekstrak yang dihasilkan dievaporasi atau diuapkan kembali diatas waterbath selama 2 jam.

4.8.2.3 Uji Fitokimia

Uji fitokimia untuk mendeteksi senyawa flavonoid, tanin, dan saponin secara kualitatif.

4.8.2.3.1 Bahan

Bahan yang dibutuhkan untuk tes fitokimia adalah larutan uji, serbuk Mg, H₂SO₄ pekat, etanol, HCl pekat, dan FeCl₃.

4.8.2.3.2 Alat

Alat-alat yang dibutuhkan untuk uji fitokimia adalah tabung reaksi, pipet tetes, gelas beker, corong gelas, penjepit tabung reaksi, spatula *stainless steel*, dan bunsen.

4.8.2.3.3 Cara Kerja

1) Identifikasi Flavonoid

0.5 mL sampel dipanaskan selama 5 menit + ditambahkan HCl pekat beberapa tetes + ditambahkan sedikit serbuk Mg -> hasil positif: warna merah tua

2) Identifikasi Tanin

1 mL sampel+ ditambahkan FeCl_3 1%-> warna positif hijau, biru, ungu, biru tua, hijau, dan kehitaman

3) Identifikasi Saponin

1 mL sampel+ ditambahkan 2 mL air panas dan dikocok kuat -> hasil positif: terbentuk buih permanen selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1cm-10 cm+ ditambahkan HCl pekat tetes-> hasil positif: busa permanen tidak hilang.

4.8.3 Identifikasi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

4.8.3.1 Pewarnaan Gram

- 1) Bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan di atas 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 di udara.

Kemudian difiksasi diatas lampu spiritus.

- 3) Sediaan dituangi dengan kristal violet. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
- 4) Sediaan dituangi dengan lugol. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
- 5) Sediaan dituangi dengan Alkohol 96%. Setelah 5-10 detik, sediaan dibilas dengan air
- 6) Sediaan dituangi dengan safranin. Setelah 30 detik, sediaan dibilas dengan air.
- 7) Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, kemudian dilihat dibawah mikroskop dengan obyektif perbesaran 100x.

4.8.3.2 Penanaman pada Media *Mc Conkey*

Dilakukan inokulasi bakteri pada media *Mc Conkey* yang kemudian diinkubasikan di dalam inkubator pada suhu 37°C, selama 18-24 jam. Penanaman ini untuk melihat pertumbuhan koloni bakteri *Ps. aeruginosa* dengan gambaran koloni besar dan low-convex, kasar, dan biasanya berbentuk oval dengan tumbuh segaris dengan garis streaking. Kultur berbau khas yang disebut "*grape like odor*" atau "*corn taco like odor*". Koloni juga memberikan warna fluoresensi hijau ketika mendapatkan cahaya.

4.8.3.3 Uji Oksidase

- 1) Mengambil koloni dari media *Mc Conkey* dengan mata ose secara aseptis.
- 2) Letakkan pada kertas saring yang terletak pada objek glass kemudian ditambah 1 tetes 1-1 *dimethyl para-phenil hidroklorida 1%*.
- 3) Tes positif apabila warna kapas di ujung cotton bud berubah menjadi

unggu dalam waktu 1/2-1 menit, yang artinya bakteri memiliki enzim sistokrom oksidase yang mengoksidasi reagen penguji.

4.8.3.4 Uji Katalase

- 1) Mengambil koloni dari media Mcconkey dengan mata ose secara aseptis.
- 2) Letakkan pada objek glass yang sebelumnya dibersihkan dengan alcohol 70%, diratakan kemudian ditambah satu tetes reagen H₂O₂ sebanyak 3%.
- 3) Tes positif apabila ditandai buih warna putih.

4.8.3.5 Uji Reaksi Biomkimia (Microbact 12A)

- 1) Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 3 - 6 mL garam fisiologis pada tabung reaksi sterill hingga homogen.
- 2) Larutan bakteri yang telah homogen ditetaskan kedalam sumur Microbact sebanyak 100 µl (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H₂S ditambah dengan tetesan mineral oil sebanyak 1 - 2 tetes. Setelah itu Microbact diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam.
- 3) Microbact yang telah diinkubasi diambil kemudian ditetaskan reagen pada sumur nomor 8 dengan Indol Kovac, sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan *Voges- Proskauer* (VP) I dan II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan *Tryptophan Deaminase Activity* (TDA) sebanyak satu tetes.
- 4) Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur Microbact apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*.
- 5) Angka-angka oktal didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka oktal).

- 6) Nama bakteri dilihat dengan komputer berdasarkan angka oktal yang didapat.

4.8.4 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Suspensi bakteri *Ps. aeruginosa* pada medium *nutrient broth* (NB) diukur dengan spektrofotometer panjang gelombang (λ) 540 sehingga diketahui kepadatan bakterinya (OD = *Optical Density*) yang setara dengan kepadatan bakteri 1×10^8 CFU/mL. Kemudian dengan rumus pengenceran $N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$;

kepadatan bakteri tersebut diencerkan 3 kali dengan NaCl menjadi 1×10^6 bakteri/mL. Dasar perhitungannya sebagai berikut: Apabila diperoleh OD bakteri hasil spektrofotometri = 0,820 (N1)

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

$$0,820 \cdot V_1 = 0,1 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1/0.820 = 1,219 \approx 2 \text{ mL}$$

Suspensi bakteri dengan konsentrasi bakteri 1×10^6 CFU/mL, dapat dibuat melalui langkah-langkah sebagai berikut :

- Suspensi bakteri *Ps. aeruginosa* sebanyak 2 mL ditambah dengan NaCl 8 mL \rightarrow menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan 1×10^8 bakteri/mL
- Ambil 1 mL larutan dengan konsentrasi bakteri 1×10^8 CFU/mL tersebut, dan masukkan ke dalam tabung yang telah diisi 8 mL NaCl. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi 1×10^7 bakteri/mL.
- Ambil lagi 1 mL larutan dengan konsentrasi bakteri 1×10^7 CFU/mL tersebut, dan masukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 mL *nutrient*

broth steril. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi 1×10^6 CFU/mL. Biakan bakteri siap digunakan untuk penelitian.

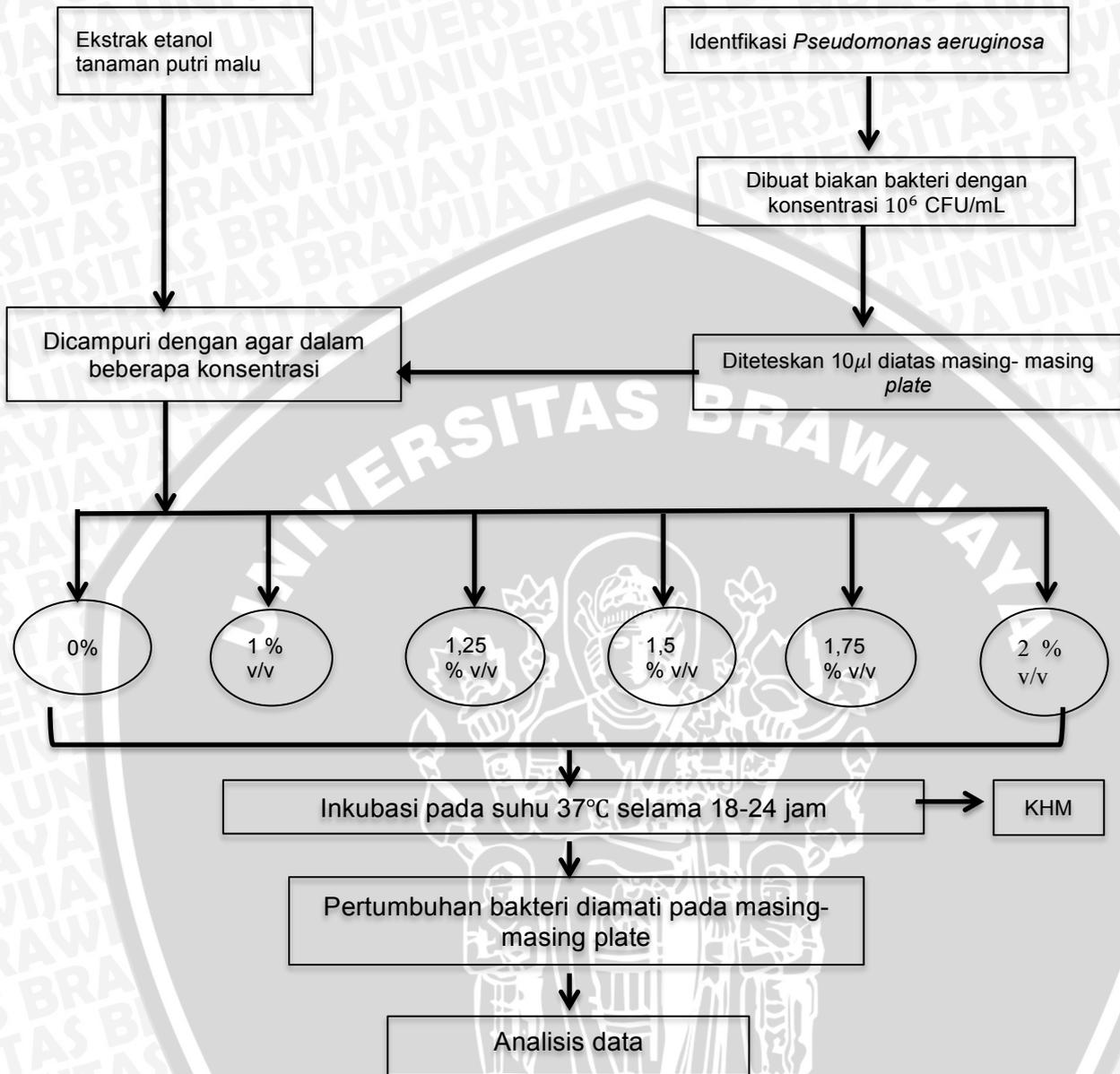
4.8.5 Uji Dilusi Agar Ekstrak Etanol Tanaman Putri Malu

- a. Disediakan 6 *plate* berdiameter 9 cm dan telah diberi tanda I, II, III, IV, V, dan VI. *Plate* sebelumnya telah disterilisasi menggunakan autoklaf (suhu 121°C selama 15 menit).
- b. Masing- masing *plate* diisi dengan larutan ekstrak etanol tanaman putri malu dengan konsentrasi (0%; 1%; 1,25 ; 1,5%; 1,75% dan 2% v/v) dan dicampur dengan *nutrient agar* (NA) yang masih cair. Volume NA yang dipakai dalam setiap *plate* adalah 10mL dengan rincian sebagai berikut:
 - Konsentrasi 0% : tanpa ekstrak+ 10mL *nutrient agar*
 - Konsentrasi 1% : 0,01 mL ekstrak etanol tanaman putri malu + 9,99 mL *nutrient agar*
 - Konsentrasi 1,25%: 0,0125mL ekstrak etanol tanaman putri malu + 9,9875 mL *nutrient agar*
 - Konsentrasi 1,5%: 0,015 mL ekstrak etanol tanaman putri malu+ 9,985 mL *nutrient agar*
 - Konsentrasi 1,75%: 0,0175 mL ekstrak etanol tanaman putri malu+ 9,825 mL *nutrient agar*
 - Konsentrasi 2%: 0,2 mL ekstrak etanol tanaman putri malu+ 9,8 mL *nutrient agar*
- c. Bakteri uji yang dipakai adalah bakteri yang diencerkan sampai 10^6 CFU/mL

- d. Keesokan harinya, setiap *plate* tersebut dibagi menjadi 4 karena dalam penelitian ini menggunakan 4 kali pengulangan yang akan ditetesi bakteri uji sebanyak $10\mu\text{l}$ (10^4 CFU/ tetes).
- e. Koloni yang tumbuh pada agar *plate* diamati. *plate* dengan konsentrasi terendah tidak ditemukan pada pertumbuhan koloni bakteri adalah *plate* dengan konsentrasi yang dapat disebut sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA





Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

4.9 Analisis Data

Data dianalisis dengan menggunakan uji statistik Kruskal Wallis untuk mengetahui adanya kemungkinan perbedaan pengaruh ekstrak tanaman putri malu terhadap bakteri *Ps. aeruginosa*. Selanjutnya dilakukan pula uji Korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian ekstrak etanol tanaman putri malu terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Ps. aeruginosa*. Dalam analisis data ini digunakan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$).

