

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *true eksperimental*, dengan menggunakan *post test only control group*. Metode yang dipakai adalah dilusi tabung (*tube dilution test*) untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) dengan berbagai konsentrasi terhadap bakteri *Escherichia coli* ESBL (*Extended Spectrum Beta-Lactamase*).

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

4.3 Bahan yang Diuji dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* ESBL (*Extended Spectrum Beta-Lactamase*) biakan murni diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan laboratorium mikrobiologi Rumah Sakit Syaiful Anwar Malang.

4.4 Estimasi jumlah pengulangan

Dalam penelitian ini, banyaknya pengulangan ditentukan dengan rumus (Rachma L, 2012):

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

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Dalam penelitian ini digunakan tujuh konsentrasi ekstrak kayu manis yang berbeda (0%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%), maka:

$$p = 7$$

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

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,143 \approx 4$$

Jadi jumlah pengulangan yang perlu dilakukan pada penelitian ini adalah empat kali.

4.5 Variabel penelitian

4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) dengan berbagai konsentrasi yang didapatkan melalui penelitian pendahuluan.

4.5.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kekeruhan pada media broth untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan jumlah koloni yang tumbuh pada medium agar padat untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM).

4.6 Definisi operasional

1. Ekstrak kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) adalah ekstrak yang diperoleh dari kulit kayu manis yang telah dikeringan, kemudian dihaluskan, direndam dengan etanol 96%, diaduk, didiamkan (metode maserasi), dan diambil filtratnya dengan penyaringan yang kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C.
2. Bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif (-) bersifat anaerob fakultatif dan tidak dapat membentuk spora. Bakteri *Escherichia coli* yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Syaiful Anwar Malang.
3. ESBL (*Extended-Spectrum Beta-Lactamase*) adalah enzim yang mempunyai kemampuan untuk menghidrolisis antibiotika golongan penicillin, cephalosporin generasi satu, dua dan tiga serta golongan aztreonam (kecuali cephameycin dan carbapenem).
4. Kontrol Negatif atau Kontrol Bakteri (KB) adalah larutan dengan ekstrak 0% (larutan aquadest).
5. Kontrol Positif atau Kontrol Bahan atau Kontrol Ekstrak (KE) adalah larutan ekstrak etanol kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) dengan konsentrasi 100%.
6. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal ekstrak etanol kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji (*Escherichia coli* ESBL). KHM didapatkan dari mengamati dan membandingkan kekeruhan atau pertumbuhan bakteri dengan kontrol yang mengandung media. KHM

didapatkan pada tabung yang jernih pada pengenceran tertinggi. Penentuan KHM dilakukan dengan metode pengenceran (tube dilution method).

7. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) yang mampu membunuh bakteri uji (*Escherichia coli*) ditandai dengan pertumbuhan koloni bakteri kurang dari 0,1% *original inoculums* pada media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) yang telah dilakukan penggoresan (*streaking*) dengan satu ose larutan ekstrak etanol kayu manis (*Cinnamomum burmanii*)

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat dan bahan identifikasi bakteri

1. Alat

Alat yang digunakan untuk identifikasi dan tes kepekaan bakteri *Escherichia coli* adalah alat *Microbact*12A/E atau 24E , cawan petri, ose, tabung reaksi, inkubator, gelas obyek, korek api, spidol permanen, pipet steril 10 ml, mikroskop, penggaris, labu Erlenmeyer, bunsen, minyak emersi, alat inkubasi, spektrofometri, dankertas penghisap.

Alat pembuatan ekstrak kulit kayu manis yaitu timbangan analitik, pisau, oven, blender, *rotary evaporator vaccum*, gelas ukur 10 ml, erlenmeyer 500 ml, erlenmeyer 1 L, *beaker glass*, tabung reaksi, mikro pipet, vortex, pengaduk kaca, kertas saring/whatman, gelas ekstraksi dan sentrifus set.

2. Bahan

Bahan untuk identifikasi *Escherichia coli* ESBL yaitu biakan murni *Escherichia coli* ESBL dengan kepadatan 10^8 bakteri/cc, aquadest, bahan

pewarna Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), bahan EMB (*Eosine Methylene Blue*), dan bahan identifikasi *Microbact* 12A/E atau 24E

Bahan untuk pembuatan ekstrak kulit kayu manis yaitu tumbukan kayu manis (500 gram sediaan kering), ethanol 96% dan *aquadest* steril. Bahan uji kepekaan ekstrak kulit kayu manis terdiri dari tiga isolate *Escherichia coli*, ekstrak etanol kayu manis (*Cinnamomum burmanii*), *Nutrient Broth*, NAP, NaCl, dan *aquadest* steril.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Sterilisasi alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan:

- a. Mencuci semua alat dengan sabun hingga bersih dan membiarkannya hingga kering.
- b. Alat-alat yang bisa disterilasi dalam autoklaf dibungkus dengan kertas roti dan dimasukkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atm, selama 15 menit. Sedangkan alat-alat yang tidak bisa disterilasi dengan autoklaf disterilkan dengan alkohol 70%.

4.8.2 Pembuatan Ekstrak kulit kayu manis

Tahapan pembuatan ekstrak kayu manis adalah sebagai berikut:

1. Kulit kayu manis kering dihaluskan dengan blender.
2. Kulit kayu manis kering ditimbang dan diambil sebanyak 100 g.
3. Kulit kayu manis kering dimasukkan dalam tabung erlenmeyer.
4. Kemudian ditambahkan ethanol 96% sampai 900 ml.

5. Tutup tabung erlenmeyer dengan rapat lalu kocok sampai homogen. Pengocokan dilakukan 1-2 jam, lalu disimpan pada suhu kamar selama 24 jam.
6. Setelah 24 jam, campuran disaring dengan kertas filter hingga diperoleh cairan yang bebas dari partikel kasar.
7. Hasil selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak etanol kayu manis menggunakan *rotary evaporator* pada temperatur 65°C (sesuai titik didih etanol) hingga semua pelarut terpisah dan didapatkan cairan ekstrak yang kental dengan konsentrasi 100%.
8. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam percobaan yaitu ekstrak etanol kayu manis konsentrasi 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut etanol.

4.8.3 Pengenceran Ekstrak Kayu Manis

Tahapan pengenceran ekstrak kayu manis adalah sebagai berikut:

1. Konsentrasi 17,5% = 0,175 ml ekstrak kayu manis 100%
2. Konsentrasi 15% = 0,15 ml ekstrak kayu manis 100% + 0,85 ml aquades
3. Konsentrasi 12,5% = 0,125 ml ekstrak kayu manis 100% + 0,875 ml aquades
4. Konsentrasi 10% = 0,1 ml ekstrak kayu manis 100% + 0,9 ml aquades
5. Konsentrasi 7,5% = 0,075 ml ekstrak kayu manis 100% + 0,925 ml aquades
6. Konsentrasi 5% = 0,05 ml ekstrak kayu manis 100% + 0,95 ml aquades
7. Konsentrasi 0% = 1 ml aquades

4.8.4 Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*

4.8.4.1 Pewarnaan gram

- Langkah-langkah melakukan pewarnaan Gram adalah sebagai berikut:
- Bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak. Kemudian biarkan dingin.
- 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.
- Sediaan dituangi dengan Kristal Violet. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
- Kemudian sediaan dituangi dengan Lugol. Setelah 1 menit, sediaan di bilas dengan air.
- Sediaan dituangi dengan alkohol 96%. Setelah 5-10 detik, sediaan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi dengan Safranin. Setelah setengah menit, sediaan dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan obyektif perbesaran 100x (Dzen *et al*, 2010).

Hasil positif: *Escherichia coli* berbentuk batang dan berwarna merah (bersifat Gram negatif).

4.8.4.2 Biakan pada EMB Agar

- Siapkan sediaan bakteri yang akan dibiakan dan siapkan media EMB Agar yang akan digunakan
- Buat goresan pada media EMB Agar dari sediaan bakteri yang sudah disiapkan

- Inkubasi dengan temperatur 35°C selama 18 jam sampai 24 jam untuk diidentifikasi

Hasil positif: Koloni berdiameter 2 mm - 3 mm warna hitam atau gelap pada bagian pusat koloni, dengan metalik kehijauan yang mengkilap pada media EMB Agar.

4.8.4.3 Biakan Bakteri pada Mac Conkey Agar

- Siapkan sediaan bakteri yang akan dibiakan dan siapkan media Mac Conkey Agar yang akan digunakan
- Buat goresan pada media Mac Conkey Agar dari sediaan bakteri yang sudah disiapkan
- Inkubasi dengan temperatur 35°C selama 18 jam sampai 24 jam untuk diidentifikasi

Hasil positif: Terdapat perubahan warna menjadi merah muda atau pink pada koloni *Escherichia coli*.

4.8.4.4 Uji IMViC

- Uji produksi Indol: Inokulasi koloni dari EMB agar pada media SIM dan inkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam. Kurang lebih 2 jam teteskan larutan Erlich 1-3 tetes. Hasil positif ditandai dengan adanya bentuk cincin merah pada lapisan atas media.
- Uji *Voges-Proskauer*: Ambil biakan dari media EMB agar lalu inokulasikan pada tabung yang berisi 10 ml media MR-VP dan inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam \pm 2 jam. Pindahkan 5 ml MR-VP ke tabung reaksi dan tambahkan 0,6 ml larutan alpha-naphthol dan 0,2 ml KOH 40%

kemudian digoyang-goyangkan. Hasil positif ditandai dengan adanya warna merah muda eosin dalam waktu 2 jam.

- Uji *Methyl-Red*: Ambil biakan dari media EMB agar lalu inokulasikan pada tabung yang berisi 10 ml media MR-VP dan inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam \pm 2 jam. Tambahkan 2-5 tetes indikator MR pada tabung. Hasil positif ditandai dengan adanya warna merah.
- Uji Citrat: Inokulasikan koloni dari media EMB agar ke dalam media agar miring citrate, inkubasi pada suhu 37°C selama 96 jam. Hasil positif ditandai dengan warna tidak berubah (tetap hijau).
- Uji Urease: Inokulasikan koloni dari media EMB agar ke dalam media tabung Urease, inkubasi pada suhu 37°C selama 96 jam. Hasil positif ditandai dengan warna tidak berubah (tetap kuning).

4.8.5 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Untuk menumbuhkan bakteri *Escherichia coli* ESBL pada media *blood agar* dilakukan tahap sebagai berikut:

1. Strain bakteri *Escherichia coli* ESBL dimasukkan ke dalam tabung yang berisi *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB).
2. *Escherichia coli* ESBL yang telah diidentifikasi, dibiakkan pada medium cair dengan menggunakan *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dan disimpan dalam *anaerobic jar* selama 24 jam pada suhu 37°C.
3. *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) berisi bakteri dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer kemudian diukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda = 625$ nm. Dari hasil yang diperoleh

(OD = 0,1) sebanding dengan 1×10^8 CFU/ml, kemudian dilakukan pengenceran hingga 1×10^6 CFU/ml dengan rumus $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$.

4. Mendapatkan suspensi bakteri yang mengandung 1×10^6 dapat dilakukan dengan cara pengenceran dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 1×10^8 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,9% steril. Maka akan didapatkan suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml. Proses dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu 1×10^6 CFU/ml.
5. Pada hasil pengenceran itu, bakteri diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 1 cc dan ditetaskan ke dalam cawan petri yang telah berisi media *blood agar* dan diratakan dengan ose.

4.8.6 Uji kepekaan Ekstrak Kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) terhadap Bakteri *Escherichia coli* ESBL Menggunakan Metode Dilusi Tabung

Tahapan uji aktivitas antibakteri ekstrak Kayu manis terhadap *Escherichia coli* ESBL menggunakan metode dilusi tabung adalah sebagai berikut:

1. Disediakan 7 tabung steril, 5 tabung sebagai uji antibakteri dan 1 tabung sebagai kontrol bakteri (kontrol negatif), dan 1 kontrol bahan.
2. Dilakukan penelitian pendahuluan digunakan untuk pencarian konsentrasi. Diawali dengan konsentrasi ekstrak 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; dan 0%. Setelah itu dilakukan perapatan konsentrasi berdasarkan hasil dari penelitian tersebut hingga dicapai rentang konsentrasi tertentu.
3. Menyiapkan perbenihan cair perbenihan bakteri dengan konsentrasi 1×10^6 CFU/ml.

4. Perbenihan cair bakteri dimasukkan pada semua tabung konsentrasi di atas, masing-masing sebanyak 1 ml. Masing-masing tabung di vortex sebentar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
5. Pada Uji pendahuluan didapatkan konsentrasi 50% dan konsentrasi 25% tidak didapatkan pertumbuhan bakteri sedangkan pada konsentrasi 12.5%, 6.25%, 3.125% dan 0% menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Maka untk mencari konsentrasi yang merupakan KHM dan KBM, penelitian dilanjutkan dengan merapatkan konsentrasi dimulai dari konsentrasi 5% hingga 17.5%. Sehingga konsentrasi akhir ekstrak Kayu Manis adalah:

Tabung 1 : 17.5%

Tabung 2 : 15%

Tabung 3 : 12.5%

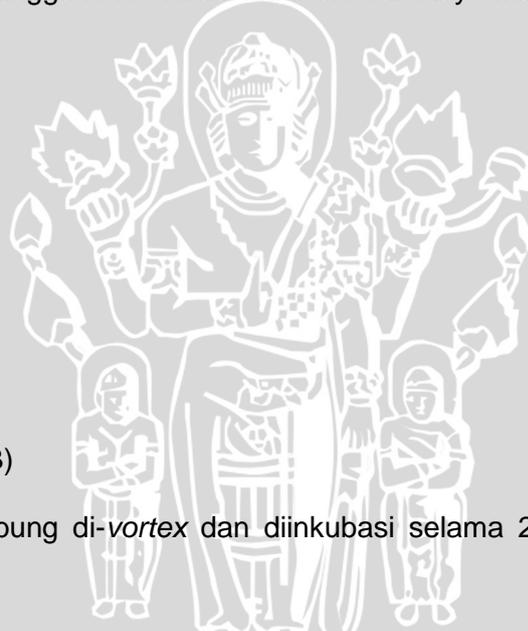
Tabung 4 : 10%

Tabung 5 : 7.5%

Tabung 6 : 5%

Tabung 7 : 0% (KB)

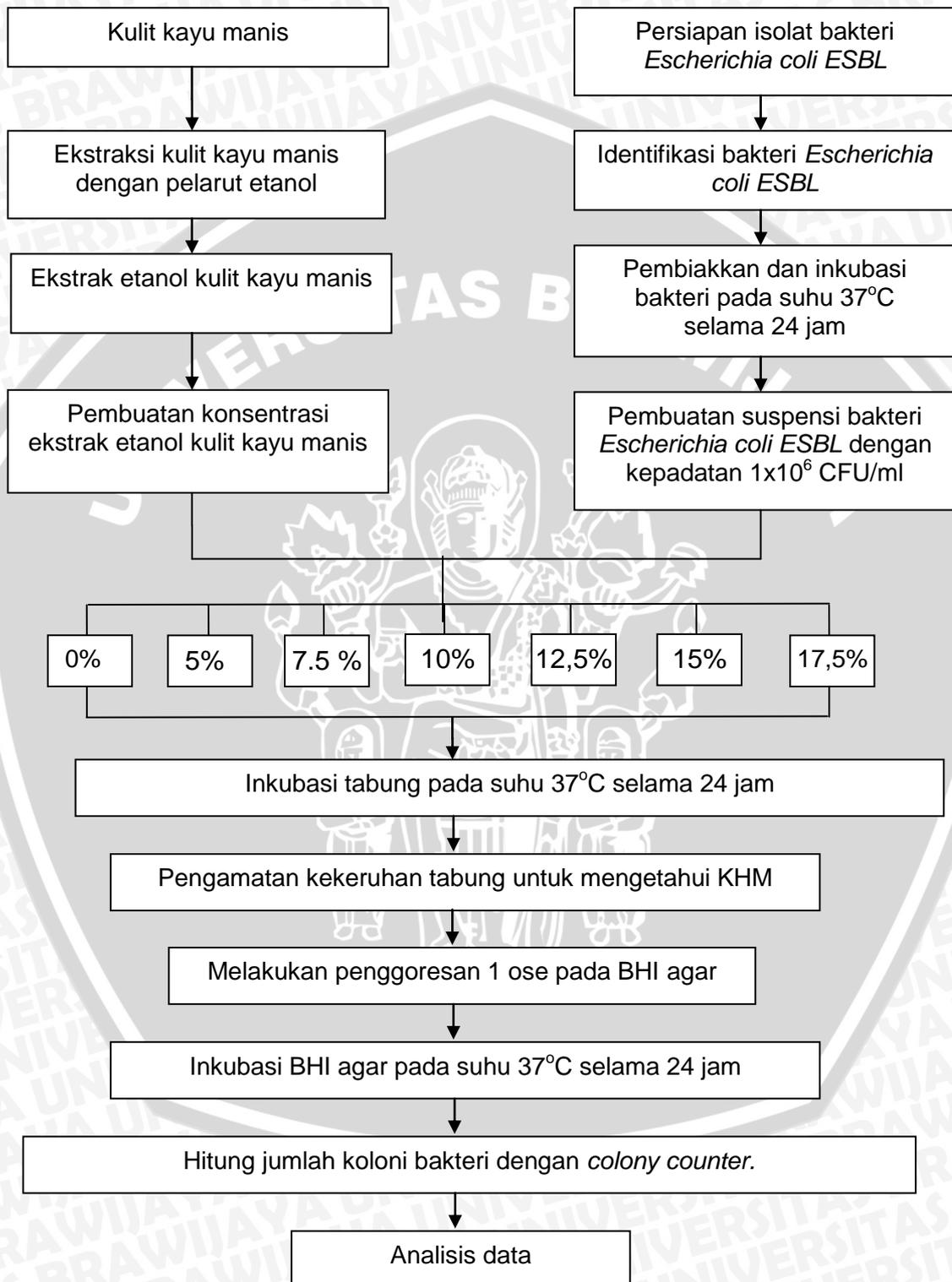
6. Masing-masing tabung di-vortex dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
7. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari incubator. Kemudian nilai KHM didapatkan dengan melihat tingkat kekeruhan tabung. Tingkat kekeruhan tabung diamati secara visual dibantu dengan kertas bergaris-garis hitam yang diletakkan di belakang tabung. Kemudian masing-masing tabung dilusi diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada media BHIA, kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C.



8. Pada hari ketiga didapatkan data KBM dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan menggunakan alat *colony counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada BHIA



4.9 Rancangan Penelitian



4.9 Analisa data

Setelah dilakukan empat kali pengulangan percobaan, kemudian hasil data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji statistik *one way* ANOVA dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *one way* ANOVA dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak kulit kayu manis terhadap jumlah koloni *Escherichia coli* ESBL. Uji korelasi untuk menunjukkan apakah ada hubungan konsentrasi ekstrak kulit kayu manis dengan jumlah pertumbuhan koloni *Escherichia coli* ESBL. Uji ini untuk mengetahui arah hubungan tersebut, apakah dengan peningkatan konsentrasi akan menjadikan penurunan jumlah koloni, dan sebaliknya, atau tidak berhubungan. Uji regresi berfungsi untuk mengetahui seberapa besar hubungan tersebut. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program *Statistical Product of Service Solution* (SPSS).