

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian true eksperimental menggunakan metode *post test control design only* yang dilakukan secara *in vitro* dan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Uji potensi antimikroba dilakukan dengan metode *tube dilution test* dengan perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak. Metode *tube dilution test* atau metode dilusi tabung menggunakan ekstrak kulit biji Jambu mete berfungsi untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri. Uji ini dilakukan 2 tahap, tahap pertama dengan menggunakan tabung dilusi untuk mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM). Tahap ke dua dengan melakukan penanaman dengan cara *streaking* pada media NAP untuk mengetahui jumlah koloni yang tumbuh pada masing-masing konsentrasi dan mengetahui Kadar Bunuh Minimal (KBM).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Program Kedokteran Hewan, Laboratorium Faal, dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan antara bulan Juni – September 2012.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan di dalam penelitian ini adalah isolat *Salmonella enteritidis* SP-1-PKH yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus:

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

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 4$$

(Kusriningrum, 2010).

Berdasarkan perhitungan diatas, maka jumlah pengulangan yang dilakukan dengan 6 perlakuan minimal adalah empat kali sehingga dibutuhkan 24 isolat *Salmonella enteritidis* SP-1-PKH.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak n-heksana kulit biji (*pericarp*) jambu mete (*Anacardium occidentale*) dengan konsentrasi 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, dan 50%.

Keterangan:

t : Jumlah perlakuan

n : Jumlah pengulangan yang diperlukan

4.4.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan dan jumlah koloni bakteri *S. enteritidis* SP-1-PKH secara *in vitro*.

4.4.3. Definisi Operasional

1. Simplisia yang digunakan pada penelitian ini berasal dari kulit biji (*pericarp*) jambu mete berwarna coklat tua, dengan sediaan semi padat berwarna hitam pekat dan dideterminasi di UPT Matera Medika Batu, Malang.
2. Ekstrak n-heksana kulit biji jambu mete adalah sediaan cairan kental berwarna coklat tua dari hasil evaporasi dengan menggunakan pelarut n-heksana yang di ekstraksi di Laboratorium Farmokologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Isolat *Salmonella enteritidis* diperoleh dari Laboratorium mikrobiologi Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dengan kode SP-1-PKH.
4. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah jumlah konsentrasi ekstrak n-heksana kulit biji jambu mete (*Anacardium occidentale*) terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. enteritidis* dengan diamati dari tingkat kekeruhan pada media *Nutrient Broth* (NB).
5. Kadar Bunuh Minimal (KBM). adalah jumlah konsentrasi ekstrak n-heksana kulit biji jambu mete (*Anacardium occidentale*) terendah

yang mampu membunuh bakteri *S. enteritidis* yang diamati dari jumlah pertumbuhan koloni bakteri pada media agar.

6. Kontrol positif (K+) adalah isolat bakteri murni setelah diinkubasi selama 24 jam yang ditanam pada media NB tanpa penambahan ekstrak.
7. Kontrol negatif (K-) adalah 100 % ekstrak tanpa penambahan bakteri.
8. *Original inoculums* (OI) adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar sebelum dilakukan inkubasi dan digunakan untuk menentukan nilai KBM.

4.5 Materi Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini oven pengering, mesin penggiling, *rotary evaporator*, tabung erlenmeyer, mikroskop, kertas penghisap, lampu bunsen, gelas objek, tabung reaksi steril, ose, mikropipet 1 ml, inkubator, lampu bunsen, label, vortex, dan spektrofotometer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut n-Heksana, aquades, DMSO dan kulit biji Jambu Mete, isolat *Salmonella enteritidis*, Pewarna gram (kristal violet, lugol, alkohol, dan safranin), minyak emersi, *Nutrient Broth* (NB), dan *Nutrient Agar Plate* (NAP).

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Ekstrak n-heksana Pericarp Jambu Mete dan Evaporasi

4.6.1.1 Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi pada penelitian ini sesuai dengan prosedur ekstraksi yang dilakukan di lab Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Proses ekstraksi diawali dengan mempersiapkan simplisia kulit biji jambu mete, kemudian ditimbang 100g dan direndam selama 24 jam dengan pelarut n-Heksana dan dihasilkan cairan berwarna hitam pekat sebanyak 30ml. Prosedur proses ekstraksi dapat dilihat pada Lampiran 2.1.

4.6.1.2 Proses Evaporasi

Proses evaporasi pada penelitian ini sesuai dengan prosedur evaporasi yang dilakukan di Lab Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Proses evaporasi dimulai dengan menyiapkan rotary evaporator pada tiang permanen dan digantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja. Hasil ekstraksi kulit biji jambu mete dimasukkan ke dalam labu evaporasi ukuran 1 liter. Kemudian dihubungkan dengan sumber listrik dan dipertahankan pada suhu 69°C (sesuai dengan titik didih n-Heksana). Proses evaporasi dapat dilihat pada (Lampiran 2.2).

4.6.2 Identifikasi Bakteri

4.6.2.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dimulai dengan mempersiapkan sampel bakteri yang akan diuji. Kemudian proses selanjutnya dilakukan sesuai dengan prosedur pada (Lampiran 2.3).

4.6.2.2 Uji Biokimia dengan Microbact 12E/12A

Tes biokimia ini dilakukan dengan *Microbact* (12E/12A) dengan prosedur pada (Lampiran 2.4).

4.6.3 Pembuatan Suspensi Bakteri

Inokulum bakteri *S. enteritidis* pada 10 ml *Nutrient Broth* (NB) dilakukan pemeriksaan spektrofotometer ($OD = 0,08-0,1 / \lambda = 625\text{nm}$) untuk mengetahui kepadatan bakteri pada NB. Konsentrasi akhir yang didapat sekitar 10^8 CFU (0,5 McFarland standar) (Chaouce *et al*, 2012). Hasilnya diketahui konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml yang setara dengan *Optical Density* (OD) dengan nilai 0.1. Perhitungan yang digunakan adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

N1 : standar McFarland

V1 : volume bakteri dengan pengenceran

N2 : nilai OD ($0.1 = 10^8$ CFU/ml)

V2 : volume bakteri murni yang diinginkan

Kemudian dilakukan pengenceran 100 kali, agar didapatkan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/ml dan suspensi bakteri siap digunakan untuk penelitian.

4.6.4 Pengujian Aktivitas Antimikroba

4.6.4.1 Prosedur Penelitian

Untuk mengetahui dosis yang akan dipakai dalam penelitian, terlebih dahulu dilakukan eksplorasi dosis ekstrak *pericarp* Jambu mete terhadap *Salmonella enteritidis*. Eksplorasi dosis dilakukan dengan menguji ekstrak *pericarp* jambu mete pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, dan 3.125%. Prosedur eksplorasi dosis ini bertujuan untuk mendapatkan rentang konsentrasi yang akan dilakukan pada penelitian dan sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Chauce *et al*, (2012), yang menyatakan bahwa untuk mendapatkan konsentrasi yang tepat pada suatu penelitian yaitu dengan melakukan eksplorasi dosis. Prosedur eksplorasi dosis dapat dilihat pada (Lampiran 2.5).

Penelitian dilakukan sesuai dengan kerangka konsep penelitian yang telah disusun pada (Lampiran 3) dengan mengacu pada penelitian yang sudah dilakukan oleh Kubo *et al* (2003).

4.7 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari hasil penghitungan jumlah koloni *S.enteritidis* pada medium NAP yang telah diinkubasi pada

suhu 37°C selama 24 jam. Hasil penghitungan jumlah koloni yang tumbuh kemudian dimasukkan ke dalam tabel.

Pada penelitian ini variabel yang akan dianalisis yaitu jumlah koloni *Salmonella enteritidis* yang tumbuh pada NAP berdasarkan tingkat konsentrasi ekstrak *pericarp* Jambu Mete menggunakan pelarut n-Heksana. Untuk mengetahui adanya keragaman antar perlakuan dilakukan uji hipotesis komperatif. Metode analisis yang dapat digunakan yaitu uji parametrik *one way* ANOVA (*analysis of variance*). Uji Tukey HSD, dan uji regresi korelasi dilakukan ketika hasil uji parametrik *one way* ANOVA menunjukkan nilai signifikansi ($p < 0,05$) yang berarti minimal terdapat satu pasang perlakuan yang berbeda secara nyata (Dahlan, 2004).

