

BAB 4**METODE PENELITIAN****4.1. Desain Penelitian**

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratorik secara *in vitro* yakni, menguji efek antibakteri dari ekstrak daun kastuba terhadap *Shigella dysenteriae*. Desain penelitian yang digunakan adalah *post-test only*. Pengujian efek antibakteri dilakukan dengan uji dilusi agar untuk menguji KHM yang dilakukan dengan pengamatan secara langsung pertumbuhan koloni bakteri yang tumbuh pada media NAP.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Farmakognosi dan Fitoterapi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pada bulan Maret 2013 sampai bulan Mei 2013.

4.3 Sampel Penelitian dan pengulangan

Pada penelitian ini menggunakan sampel isolat *Shigella dysenteriae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FKUB (Sampel penelitian ini berasal dari persediaan stock strain milik Laboratorium Kesehatan Yogyakarta berasal dari isolat standart ATCC EQAM Belgia). Jumlah pengulangan yang akan digunakan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus $p(n-1) \geq 15$ (Lukito, 1998).

dimana p = jumlah perlakuan (jumlah perlakuan pada penelitian ini sejumlah 5)

n = jumlah pengulangan dan n harus bilangan bulat

$$\text{sehingga : } p(n-1) \geq 15$$

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas didapatkan jumlah minimal yang harus dilakukan adalah empat kali pengulangan. Pada penelitian ini dilakukan empat kali pengulangan untuk setiap kali perlakuan.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun kastuba dengan variasi konsentrasi 0 % v/v; 0,2 % v/v ; 0,3 % v/v ; 0,4 % v/v ; dan 0,5 % v/v . Konsentrasi tersebut didapatkan melalui eksplorasi dosis.

4.4.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah pertumbuhan dari bakteri *Shigella dysenteriae* yang dilihat pada media NAP.

4.5 Bahan dan Alat penelitian

4.5.1 Bahan dan Alat untuk Pembuatan Ekstrak Daun Kastuba

- Bahan = 200 gram serbuk kering daun muda daun kastuba, etanol 70 %.
- Alat = Timbangan digital, kertas timbang, sendok penyusut, dua toples, batang pengaduk, corong, stirer, gelas ukur, tisu, kain flanel, kertas saring, cawan porselen, rotari evaporator dan oven.

4.5.2 Bahan dan Alat untuk Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kastuba

- Bahan =
 - Ekstrak daun kastuba, asam klorida 25 %, dan reagen wagner (uji alkaloid).
 - Ekstrak daun kastuba dan Ferri klorida 10 %(uji tannin dan fenol).
 - Ekstrak daun kastuba dan 10 ml akuades (Uji saponin).
 - Ekstrak daun kastuba, etanol 95 %, asam klorida, dan pita magnesium (Uji Flavonoid).
- Alat = Tabung reaksi, pipet tetes, tisu, dan plat porselin.

4.5.3 Bahan dan Alat untuk Identifikasi Bakteri

- Bahan = Larutan kristal violet, air, larutan lugol, alkohol 96%, safranin, minyak imersi.
- Alat = Slide, kertas penghisap, minyak imersi, mikroskop.

4.5.4 Bahan dan Alat Preparasi Inokulum Bakteri *Shigella dysenteriae*

- Bahan = Bakteri *Shigella dysenteriae*, Nutrient Broth, NaCl, Nutrient Agar.
- Alat = Ose, Tabung reaksi steril, spektrofotometri, vortex, mikropipet, kapas steril.

4.5.5 Bahan dan Alat untuk Uji Dilusi Agar

- Bahan = 50 % ekstrak daun kastuba, Nutrient Agar.
- Alat = Tabung falcon berskala, plate steril, mikropipet, lampu bunsen, korek api, dan inkubator.

4.6 Definisi Operasional

- a) Bakteri *Shigella dysenteriae* diperoleh dari Laboratorium Kesehatan Yogyakarta kemudian dikembangkan lagi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Bahan sampel penelitian isolat berasal dari standart ATCC EQAM Belgia.
- b) Daun kastuba yang digunakan pada penelitian ini adalah daun muda dari tanaman kastuba yang didapatkan dari UPT Materia Medica, Jl. Lahor no 87, Kota Batu dengan keadan geografis tanaman tumbuh pada curah hujan 256 mm/bulan, suhu rata-rata 23°C, suhu minimum 5°C, suhu maksimum 30°C, kelembapan 80 , dan ketinggian 875 m dpl.
- c) Waktu pemanenan daun kastuba adalah daun muda dengan ciri daun masih berwarna merah (untuk memudahkan penyeragaman umur pemanenan).

- d) Metode ekstraksi yang digunakan adalah Maserasi dengan remaserasi sebanyak dua kali dengan tujuan agar hasil ekstrak yang didapatkan mengandung senyawa fitokimia yang diinginkan dapat tersari seefektif mungkin (diharapkan 100% tersari).
- e) Sediaan ekstrak daun kastuba merupakan hasil ekstraksi dengan pelarut etanol 70% menggunakan daun kastuba muda yang berwarna merah yang telah dikeringkan dan dihaluskan.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Kastuba

4.7.1.1 Proses Ekstraksi dan Evaporasi

- 1) 200 gram ditimbang serbuk kering daun kastuba muda pada timbangan digital.
- 2) Serbuk dimasukkan kedalam toples 1 ditambahkan 1 liter etanol 70%.
- 3) Cairan serbuk distirer selama 2 jam dengan kecepatan 450 rpm (dimatikan tiap 30 menit).
- 4) Toples 1 ditutup dan didiamkan selama 5 x 24 jam (5 hari). Setelah 5 x 24 jam toples 1 dibuka.
- 5) Maserat disaring menggunakan kain flanel hasil maserasi ditampung pada toples 2.
- 6) Ampas hasil maserasi dimasukkan kembali dalam toples 1 dan ditambahkan 1 liter etanol 70% sambil diaduk menggunakan batang pengaduk hingga homogen (Remaserasi pertama).
- 7) Toples 1 ditutup dan didiamkan selama 1 x 24 jam.

- 8) Hasil disaring menggunakan kain flanel, di campur dan dimasukkan pada toples 2.
- 9) Prosedur 7 sampai 9 diulangi (Remaserasi kedua).
- 10) ± 3 liter ekstrak etanol daun kastuba didapatkan berwarna merah kecoklatan .
- 11) Ekstrak daun kastuba di rotav pada suhu 40°C dengan kecepatan 45 rpm, dalam 4 kali rotav dengan rata-rata waktu rotav 50 menit – 1jam 50 menit.
- 12) Hasil rotav ekstrak daun kastuba yang didapatkan menjadi kental pekat berwarna merah kehitaman. Pada penelitian ini ekstrak yang didapatkan dianggap konsentrasi 100 %.
- 13) Hasil rotav dioven pada suhu 38°C - 40°C selama 5 hari dan didapatkan 24 ml ekstrak daun kastuba sangat kental dan lebih pekat.
- 14) Ekstrak disimpan dalam lemari es bersuhu -20°C.

4.7.1.2 Uji fitokimia

1. Uji alkaloid

3 ml ekstrak dimasukkan pada tabung reaksi, dilarutkan dalam asam klorida dan ditambah dengan beberapa tetes reagen wagner terbentuknya endapan coklat menunjukan positif alkaloid (Tiwari *et al.*, 2011; Srujana *dkk.*, 2012).

2. Uji tannin dan fenol

3 ml ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah beberapa tetes larutan Ferri clorida 10%. Terbentuknya warna menjadi biru kehitaman menunjukkan kandungan tannin (Dewi *dkk.*, 2005; Tiwari *et al.*, 2011; Srujana *dkk.*, 2012).

3. Uji saponin

Pengujian kandungan saponin dilakukan dengan metode Forth yaitu dengan cara memasukkan 2 mL sampel ke dalam tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan 10 mL akuades lalu dikocok selama 30 detik, diamati perubahan yang terjadi. Apabila terbentuk busa yang menetap (tidak hilang selama 30 detik) maka identifikasi menunjukkan adanya saponin (Dewi *dkk.*, 2005).

4. Uji flavonoid

3 ml Ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 ml etanol 95%, kemudian di tambahkan beberapa tetes HCl dan beberapa potongan magnesium. Terbentuknya warna pink menunjukkan adanya flavonoid (Srujana *dkk.*, 2012).

4.7.2 Identifikasi Bakteri *Shigella dysenteriae*

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pewarnaan gram yakni (Dzen *et al.*, 2003) :

- 1) Dibuat sediaan (slide), dikeringkan di udara kemudian dilakukan fiksasi.
- 2) Sediaan dituangi kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit.

- 3) Sisa bahan berwarna dibuang dan dibilas dengan air.
- 4) Sediaan dituangi larutan lugol sebagai mordant, dibiarkan selama 1 menit.
- 5) Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- 6) Sediaan dituangi alkohol 96% sebagai peluntur selama 1 menit.
- 7) Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- 8) Sediaan dituangi safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik.
- 9) Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- 10) Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak imersi dan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 97-100x.

4.7.2.2 Uji Biokimia

Uji biokimia *lysine*, *ornithine*, H₂S, glukosa, manitol, *xylose*, ONPG, indol, urease, V-P, citrat, TDA dengan Microbact. Uji ini dilakukan menggunakan System komputerisasi.

4.7.3 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kastuba Metode Dilusi Agar

4.7.3.1 Preparasi Original Inoculum (Pembuatan larutan Pembenihan bakteri) *Shigella dysenteriae*

4.7.3.1.1 Pembuatan Larutan Pembenihan 1 x 10⁸ CFU/ml

- 1) Koloni bakteri *Shigella dysenteriae* pada media NAP diambil menggunakan Ose. Dimasukkan kedalam tabung reaksi steril yang berisi NB selanjutnya divortex kemudian, dinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C.

- 2) Larutan suspensi diukur menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm, untuk mengetahui optical density (OD) dari suspensi.

Hasil spektrofotometri dicatat sebagai nilai N_1 .

- 3) Volume *Shigella dysenteriae* yang akan diambil dari larutan suspensi yang telah diketahui ODnya dihitung dengan perhitungan (Muliani dan Hala, 2003) :

$$\begin{aligned} N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\ \text{Nilai OD} \times V_1 &= 0,1 \times 5 \\ V_1 &= 0,5 / \text{nilai OD} \end{aligned}$$

Keterangan:

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengenceran (volume *Shigella dysenteriae* yang akan diambil dari tabung reaksi).

N_1 = Hasil spektrofotometri (Nilai absorbansi suspensi) nilai OD yang diperoleh dari prosedur no 2 sebelumnya.

$N_2 = 0,1$ setara dengan 10^8 CFU/ml.

$V_2 = 5$ ml setara dengan volume suspensi bakteri uji yang diharapkan (5 ml).

Perhitungan pada penelitian ini yakni :

$$\begin{aligned} N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\ 0,424 \times V_1 &= 0,1 \times 5 \\ V_1 &= 1,2 \text{ ml} \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan diatas maka diperoleh V_1 (1,2 ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 /mL sebanyak 5 mL.

- 4) Larutan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* diambil sebanyak V_1 (1,2 ml) dari tabung reaksi. Dimasukkan dalam tabung reaksi steril dan ditambahkan larutan NaCl (3,8 ml) sampai volume total pada tabung reaksi tersebut mencapai 5 ml kemudian, divortex hingga homogen ditutup dengan kapas steril (didapatkan biakan cairan larutan pembedihan bakteri 1×10^8 CFU/ml).

4.7.3.1.2 Pembuatan larutan pembenihan 1×10^6 CFU/ml

- 1) Dua tabung reaksi steril disiapkan
- 2) Pada masing-masing tabung reaksi diisi 9 ml Nutrient Agar .
- 3) 1 ml larutan diambil dari larutan konsentrasi 1×10^8 CFU/ml kemudian, dimasukkan pada salah satu tabung reaksi yang telah diisi 9ml Nutrient Agar, divortex hingga homogen, dan ditutup menggunakan kapas steril, sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 1×10^7 CFU/ml.
- 4) 1 ml larutan diambil dari larutan konsentrasi 1×10^7 CFU/ml kemudian, dimasukkan pada tabung reaksi kedua yang telah diisi 9ml Nutrient Agar, divortex hingga homogen, dan ditutup menggunakan kapas steril, sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 1×10^6 CFU/ml. Larutan ini siap digunakan untuk dilusi agar.

4.7.3.2 Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Daun Kastuba Eksplorasi dosis dan Penentuan KHM

Perhitungan konsentrasi menggunakan rumus :

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

N_1 = Konsentrasi ekstrak yang digunakan (50 % ekstrak)

V_1 = Volume ekstrak yang digunakan pada uji

N_2 = Konsentrasi ekstrak yang digunakan pada uji (variasi ekstrak)

V_2 = Volume NAP yang digunakan (20 ml)

- Konsentrasi 0 % v/v $V_{1 \text{ ekstrak}_1} = (0\% \times 20 \text{ ml}) / 50\% = 0 \text{ ml}$ (kontrol)

- Konsentrasi 0,2 % v/v $V_{1 \text{ ekstrak2}} = (0,2\% \times 20 \text{ ml}) / 50 \% = 0,08 \text{ ml}$
- Konsentrasi 0,3 % v/v $V_{1 \text{ ekstrak3}} = (0,3\% \times 20 \text{ ml}) / 50 \% = 0,12 \text{ ml}$
- Konsentrasi 0,4 % v/v $V_{1 \text{ ekstrak4}} = (0,4\% \times 20 \text{ ml}) / 50 \% = 0,16 \text{ ml}$
- Konsentrasi 0,5 % v/v $V_{1 \text{ ekstrak5}} = (0,5\% \times 20 \text{ ml}) / 50 \% = 0,2 \text{ ml}$

4.7.3.3 Pembuatan Media Dilusi Agar Eksplorasi Dosis dan Penentuan KHM

- 1) 5 plate steril diberi tanda : 0% v/v (kontrol); 0,2% v/v; 0,3%v/v; 0,4% v/v; dan 0,5%v/v dan diambil beberapa ml ekstrak sesuai variasi konsentrasi menggunakan mikropipet dimasukkan kedalam tabung falcon berskala.
- 2) Ditambahkan nutrient agar hangat-hangat sampai volume dalam tabung mencapai 20 ml. Digoyang-goyang sampai homogen kemudian dituangkan kedalam plate steril sesuai konsentrasi.
- 3) Plate media didiamkan sampai dingin dan memadat.
- 4) Semua plate dimasukkan kedalam inkubator selama 24 jam, untuk memastikan agar dalam plate tidak terkontaminasi.

4.7.3.4 Penanaman Bakteri *Shigella dysenteriae* Pada Media NAP

- 1) Media NAP yang telah dibuat sebelumnya dikeluarkan dari inkubator, dibagi menjadi empat bagian sama luas dengan spidol marker.
- 2) Setiap bagian pada masing-masing plate ditetesi bakteri uji sebanyak 1×10^4 CFU/ml (Forbes, 2007). Pemberian bakteri uji sebanyak 1×10^4 CFU/ml pada NAP dengan cara meneteskan 10 μ l larutan dari larutan pembenihan bakteri konsentrasi 1×10^6 CFU/ml.

- 3) Media NAP di atas didiamkan beberapa menit hingga tetesan bakteri pada media meresap kedalam agar.
- 4) Semua media NAP dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam, untuk memastikan agar dalam plate tidak terkontaminasi.

4.7.3.7 Penentuan KHM

- Pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysenteriae* diamati secara langsung. Konsentrasi ekstrak terendah yang menunjukkan tidak ada pertumbuhan koloni *Shigella dysenteriae* adalah konsentrasi KHM.
- Hasil penentuan KHM dibuat analisis dan kesimpulan mengenai data yang diperoleh dari hasil percobaan yang telah dilakukan.

4.8 Analisis Data

Nilai KHM yang diperoleh diperlihatkan secara kualitatif. Data penelitian berdasarkan pertumbuhan koloni *Shigella dysenteriae* dengan konsentrasi ekstrak daun kastuba pada NAP berupa data ordinal, sehingga menggunakan analisis statistik non parametrik dengan dilakukan uji statistik menggunakan :

- Uji statistik Kruskal Wallis untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak daun kastuba terhadap pertumbuhan *Shigella dysenteriae* pada NAP.
- Uji statistik Mann Whitney untuk mengetahui perbandingan berganda terhadap data yang berskala ordinal pada penelitian ini yakni data kualitatif mengenai pertumbuhan koloni *Shigella dysenteriae* yang

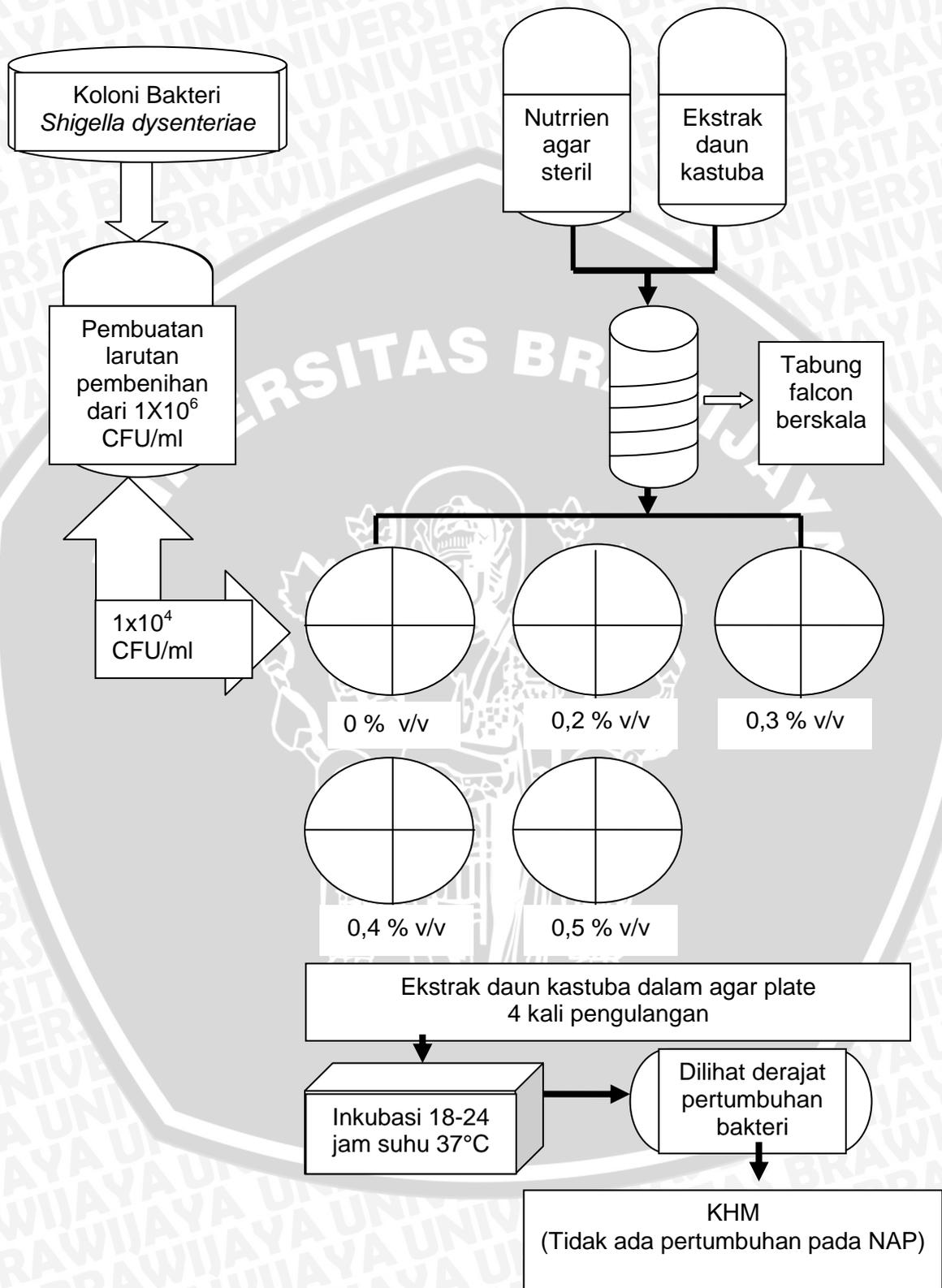
dihasilkan pada NAP, apakah setiap perlakuan menunjukkan efek yang berbeda.

- Uji statistik Korelasi Spearman untuk mengetahui dose-effect relationship antara beberapa tingkat konsentrasi ekstrak daun kastuba terhadap tingkat pertumbuhan koloni *Shigella dysenteriae*. Uji korelasi dilakukan dengan taraf kepercayaan 95% dengan nilai $\alpha = 0,05$, bermakna bila $p < 0,05$.
- Pertumbuhan bakteri pada penelitian ini diinterpretasikan melalui kriteria yang tertera pada Tabel 4.1 sebagai berikut ini :

Tabel 4.1 Kriteria Interpretasi Pertumbuhan Bakteri pada Medium NAP

Skor	Keterangan
0	Tidak ada pertumbuhan bakteri
+1	Pertumbuhan bakteri hampir tidak terlihat, tidak terlihat adanya jarak antar koloni sehingga tampak merata, rapat, dan sangat tipis.
+2	Pertumbuhan bakteri tidak terlihat adanya jarak antar koloni sehingga tampak merata, rapat, dan lebih tipis.
+3	Pertumbuhan bakteri tidak terlihat adanya jarak antar koloni sehingga tampak merata, rapat, dan agak tipis.
+4	Pertumbuhan bakteri tidak terlihat adanya jarak antar koloni sehingga tampak merata, rapat, jelas, dan agak tebal.
+5	Pertumbuhan bakteri tidak terlihat adanya jarak antar koloni sehingga tampak merata, rapat, sangat jelas, dan tebal.

Berdasarkan kriteria interpretasi pertumbuhan bakteri pada Tabel 4.1 maka analisis data dilakukan menggunakan analisis statistik non parametrik yang telah disebutkan sebelumnya.



Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kastuba Terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae*