

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *true experiment post test only control group*. Uji antimikroba dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan *tube dilution test* untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun *rosemary* (*Rosmarinus officinalis*) sebagai antimikroba terhadap *E. coli*. Ekstrak daun *rosemary* didapatkan dengan cara ekstraksi dengan metode evaporasi. Uji ekstrak daun *rosemary* sebagai antimikroba menggunakan *tube dilution test* untuk mengetahui KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal).

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang yang dilakukan selama bulan September sampai bulan Oktober 2013.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun *rosemary* dan menggunakan bakteri uji *Escherichia coli* dengan kepadatan 10^6 CFU/ml yang dikembangbiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Banyaknya pengulangan yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$p(n-1) \geq 16$$

$$6(n-1) \geq 16$$

$$6n - 6 \geq 16$$

$$6n \geq 22$$

$$n \geq 3,667 \approx 4$$

keterangan : n = jumlah pengulangan yang diperlukan

p = jumlah perlakuan

Jadi jumlah pengulangan yang perlu dilakukan pada penelitian ini adalah 4 kali (Solimun, 2001).

4.4 Variable Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun *rosemary* (*Rosmarinus officinalis*) yang dibuat dengan konsentrasi akhir 0%, 23% , 24%, 25%, 26%, 27%, dan 100%.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah tingkat pertumbuhan *E. coli* yaitu menghitung jumlah koloni bakteri *E. coli* yang tumbuh pada media agar padat (NAP) untuk menentukan KBM.

4.5 Definisi Operasional

1. Daun *rosemary* (*Rosmarinus officinalis*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *rosemary* kering dalam kemasan *Jay's Kitchen: Rosemary leaves* yang didapatkan dari pasar sawalayan yang ada di kota Malang.
2. Ekstrak daun *rosemary* adalah kadar atau konsentrasi ekstrak daun *rosemary* yang didapatkan dengan cara ekstraksi metode maserasi.

3. Isolat bakteri *E. coli* yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat urine yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
4. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal larutan ekstrak daun *rosemary* yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* yang ditandai dengan warna cairan dalam tabung reaksi sudah tampak jernih (Dzen *dkk*, 2003).
5. Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi minimal ekstrak daun *rosemary* yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri *E. coli* yang ditandai dengan sudah tidak ada lagi pertumbuhan koloni bakteri pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP) (Dzen *dkk*, 2003; Kurniastuty, 2008).
6. Kontrol bahan adalah ekstrak daun *rosemary* murni yang tidak dicampur bakteri *E. coli*.
7. Kontrol kuman adalah biakan bakteri murni yang tidak dicampur dengan ekstrak daun *rosemary*.
8. Penghitungan kuantitatif digunakan untuk menentukan pertumbuhan bakteri uji *E. coli* dengan menghitung koloni bakteri dengan metode *colony counter* (Kurniastuty, 2008).

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun *rosemary*:

- | | |
|--------------------------------|-------------------------|
| 1. Daun <i>rosemary</i> kering | 5. Blender |
| 120g | 6. Oven |
| 2. Aquades | 7. Timbangan |
| 3. Ethanol 96% | 8. Gelas Erlenmeyer (2) |
| 4. Neraca analitik | 9. Corong gelas (1) |

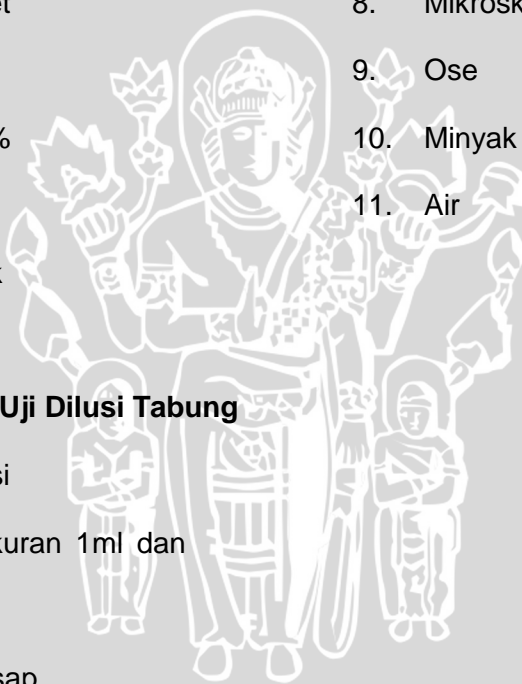
10. Kertas saring (1)
11. Labu evaporator (1)
12. Labu penampung etanol (1)
13. Pendingin spiral / rotator evaporator (1)
14. Selang water pump (1)
15. Water bath
16. Vacuum pump

4.6.2 Alat dan Bahan Pewarnaan Gram Bakteri

1. Isolat bakteri *E. coli*
2. Kristal Violet
3. Lugol
4. Alkohol 96%
5. Safranin
6. Gelas objek
7. Kertas penghisap
8. Mikroskop binokuler
9. Ose
10. Minyak emersi
11. Air

4.6.3 Alat dan Bahan Uji Dilusi Tabung

1. Tabung reaksi
2. Pipet seril ukuran 1ml dan 10ml
3. Karet penghisap
4. Inkubator
5. Ekstrak daun *rosemary*



6. Vortex
7. Perbenihan cair standar
8. Bunsen
9. Valcon 15 ml
10. Ose
11. Korek api
12. Glass objek
13. Plate kosong dan steril
14. Alat penjepit (skalpel) steril
15. Kapas
16. *Colony counter*

4.7 Rancangan Operasional Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun *rosemary*

1. Daun *rosemary* kering sebanyak 120g dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 L lalu rendam dengan ethanol 96% sampai volume 1000 ml. Campuran didiamkan 1 malam sampai mengendap.
2. Larutan campuran ekstrak dan ethanol diambil dan diletakkan dalam gelas ekstraksi kemudian di evaporasi dengan menggunakan rotary evaporator
3. Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja percobaan dengan susunan dari bawah ke atas: alat pemanas air, labu penampung hasil, *rotatory evaporator*, dan tabung pendingin

4. Tabung pendingin dihubungkan dengan alat pompa sirkulasi air dingin dengan bak penampung air dingin melalui pipa plastic, tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.
5. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu ekstraksi, kemudian dirangkai kembali.
6. *Rotatory evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan
7. Pemanas aquades dinyalakan juga sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi ikut mendidih dan pelarut etanol mulai menguap
8. Hasil penguapan etanol akan dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tercampur dengan hasil evaporasi sedangkan uap lain tersedot pompa vakum.
9. Setelah kental maka proses evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil.
10. Setelah evaporasi selesai, ekstrak dipanaskan dengan oven kembali dengan suhu 80°C selama 2 jam karena titik didih etanol adalah 80°C. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa etanol 96% yang mungkin masih tersisa dalam ekstrak.
11. Hasil ekstraksi yang diperoleh berupa campuran zat padat dan cair yang berwarna coklat gelap. Dari 120 gram daun *rosemary* kering diperoleh ekstrak sebanyak 80 ml.

4.7.2 Identifikasi Bakteri *E. coli*

Sebelum digunakan untuk penelitian, isolat *E. coli* yang diperoleh diidentifikasi ulang dengan beberapa metode identifikasi antara lain: perwarnaan

Gram (didapatkan bentuk *Gram* negatif), penanaman pada media Eosin Methylen Blue (EMB), dan Microbact Test 12A/E - 24E.

1. Pewarnaan gram

1. Bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan diatas 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 dibiarkan kering diudara. Kemudian difiksasi diatas lampu bunsen.
3. Sediaan dituangi dengan Kristal Violet. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
4. Kemudian sediaan dituangi dengan Lugol. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
5. Sediaan dituangi dengan alcohol 96%. Setelah 5-10 detik, sediaan dibilas dengan air.
6. Sediaan dituangi dengan Safranin. Setelah setengah menit, sediaan dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan obyektif perbesaran 100x (Dzen *dkk*, 2003).

2. Penanaman pada media Eosin Methylen Blue (EMB)

1. Siapkan 1 buah cawan petri berisi media EMB yang sebelumnya telah didinginkan.
2. Ambil biakan bakteri dengan ose kemudian lakukan streaking pada permukaan medi EMB secara merata.
3. Tutup cawan petri, kemudia letakkan dalam inkubator dengan suhu 37° C untuk diinkubasi selama 24 jam.

4. Setelah 24 jam, lakukan pengamatan warna pada koloni bakteri yang tumbuh.

4.7.3 Persiapan Suspensi Bakteri Uji

1. Beberapa koloni *E. coli* dipindahkan ke tabung reaksi steril yang berisi *nutrient broth* dengan menggunakan ose.
2. Lakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625nm, untuk mengetahui *optical density* (OD) dari suspensi tersebut.
3. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml (sesuai standar McFarland 0,5) yang setara dengan OD (*Optical Density*) =0,1, lakukan perhitungan sebagai berikut:

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

Keterangan:

N_1 = Hasil spektrofotometri

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengencer

N_2 = OD (0,1 setara dengan 10^8 CFU/ml)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10ml)

Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 /ml sebanyak 10 ml

4. Lakukan pengenceran suspensi bakteri sebesar 1/100 dari konsentrasi semula untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml, caranya: Dari 10 ml bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl,

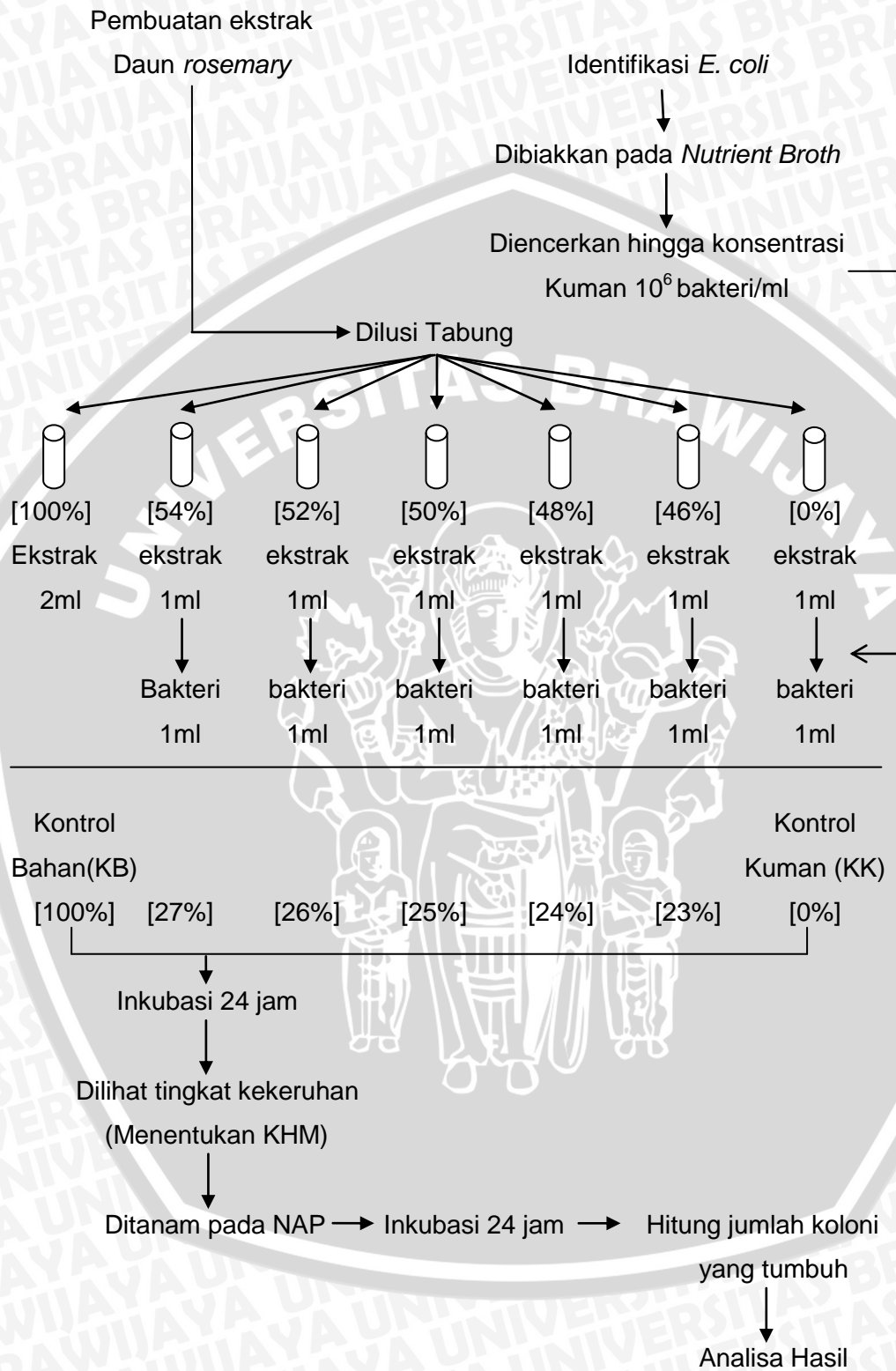
aduk rata sampai larutan homogen sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^7 CFU/ml. Lalu dari larutan dengan konsentrasi bakteri 10^7 CFU/ml tersebut diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml *nutrient broth*, aduk rata sampai larutan homogen, sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/ml (Dzen dkk, 2003).

4.7.4 Uji Kepekaan Antimikroba Ekstrak Daun *Rosemary*

Uji Dilusi Tabung:

1. Sediakan 7 tabung steril, 5 tabung sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol bahan, dan 1 tabung sebagai kontrol kuman.
2. Masukkan 1 ml NaCl 0,9% ke dalam tabung bertanda 0% tanpa penambahan ekstrak daun *rosemary* sehingga mencapai konsentrasi bahan 0% (kontrol kuman).
3. Masukkan 0,54 ml NaCl 0,9% ke dalam tabung bertanda 46% lalu tambahkan 0,46 ml ekstrak daun *rosemary* sehingga mencapai konsentrasi bahan 46%.
4. Masukkan 0,52 ml NaCl 0,9% ke dalam tabung bertanda 48% lalu tambahkan 0,48 ml ekstrak daun *rosemary* sehingga mencapai konsentrasi bahan 48%.
5. Masukkan 0,50 ml NaCl 0,9% ke dalam tabung bertanda 50% lalu tambahkan 0,50 ml ekstrak daun *rosemary* sehingga mencapai konsentrasi bahan 50%.
6. Masukkan 0,48 ml NaCl 0,9% ke dalam tabung bertanda 52% lalu tambahkan 0,52 ml ekstrak daun *rosemary* sehingga mencapai konsentrasi bahan 52%.

7. Masukkan 0,46 ml NaCl 0,9% ke dalam tabung bertanda 54% lalu tambahkan 0,54 ml ekstrak daun *rosemary* sehingga mencapai konsentrasi bahan 54%.
8. Masukkan 2 ml ekstrak daun *rosemary* ke dalam tabung bertanda 100% tanpa penambahan NaCl 0,9% sehingga didapatkan konsentrasi bahan 100% (kontrol bahan).
9. Tambahkan 1 ml biakan cair *E. coli* dengan konsentrasi bakteri 1×10^6 CFU/ml ke dalam setiap tabung sehingga total volume menjadi 2ml kecuali pada tabung bertanda 100% (kontrol bahan).
10. Konsentrasi akhir yang didapatkan adalah 0% (kontrol kuman), 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, dan 100% (kontrol bahan)
11. Masukkan seluruh tabung ke dalam inkubator dan inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
12. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. Kemudian lakukan penilaian kualitatif dengan melihat kekeruhan biakan di dalam tabung.
13. Setelah ditentukan tabung yang mulai tampak jernih sebagai KHM, lakukan penggoresan satu ose (10 μ l) pada *Nutrient Agar Plate* (NAP) untuk semua konsentrasi. Kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C.
14. Pada hari ketiga dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter* didapatkan data KBM. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada NAP.



Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian

4.8 Analisis Data

Data penelitian adalah jumlah koloni *E. coli* dan analisis data yang digunakan adalah *one way ANOVA* apabila data terdistribusi normal dan homogen. Apabila data tidak terdistribusi normal dan homogen, analisis data dilakukan dengan uji nonparametrik Kruskal-Wallis. Dengan menggunakan ANOVA atau Kruskal-Wallis, maka akan diketahui apakah ada perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak daun *rosemary* terhadap *E. coli*. Setelah itu dilakukan uji statistik multi komparasi Mann-Whitney untuk melihat apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri antara dua macam dosis yang berbeda. Selanjutnya dilakukan uji korelasi Spearman's Rho yang bertujuan untuk menentukan besarnya pengaruh dan arah korelasi antara konsentrasi ekstrak daun *rosemary* terhadap pertumbuhan *E. coli* secara *in-vitro*. Dalam penelitian ini, besar interval kepercayaan yang dipakai adalah 95% ($\alpha = 0,05$).