

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris (*true experiment–post test only control group design*) dengan menggunakan metode *tube dilution* untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) sebagai antimikroba terhadap bakteri *S. pyogenes*.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah jumlah koloni kuman *S. pyogenes* yang diperoleh dari isolat laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Besar sampel yang diperlukan dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4 \quad (\text{Notobroto,2005})$$

Keterangan:

n : Jumlah pengulangan = 4 kali

p : Jumlah percobaan = 5 konsentrasi

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan jumlah koloni *S. pyogenes*.

4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) dengan konsentrasi 17%, 19%, 21%, 23%, 25%.. Konsentrasi tersebut merupakan hasil perapatan konsentrasi dengan metode pengenceran secara seri.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan dari bulan Juli sampai dengan November 2013 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pandan wangi segar yang diambil dari beberapa rumah di Jalan sigura-gura, Malang, akuades (H₂O), etanol 96% (C₂H₅OH), NaCl, *Nutrient Broth (NB)*, *Nutrient Agar (NA)*. Bahan untuk tes pewarnaan gram : kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin, kertas penghisap, cakram basitrasin.

4.5.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah : petridish, beaker glass, tabung reaksi, erlenmayer , rak tabung, corong *buchner* , bunsen, pengaduk, jarum ose, timbangan analitik, mikroskop, kapas steril, pipet , lemari

pendingin, gelas ukur, kertas saring, autoklaf, spektrofotometer, rotary evaporato, shaker inkubator, inkubator, dan botol steril.

4.6 Definisi Operasional

- a. Daun pandan wangi berwarna hijau tua diambil dari beberapa rumah di jalan sigura gura, Malang. Daun pandan wangi yang diambil, kemudian dilakukan uji identifikasi oleh Fakultas Biologi Universitas Brawijaya (Lampiran 1).
- b. Ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) adalah ekstrak yang diperoleh dari daun pandan wangi yang telah dikeringkan, kemudian dihaluskan, direndam dalam etanol 96%, diaduk, didiamkan (maserasi), dan diambil filtratnya dengan penyaringan yang kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C (Primivanny, 2012).
- c. *Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri gram positif grup A yang bersifat β -hemolitik. Koloni *S. pyogenes* tampak kecil-kecil dengan ukuran >1mm. Pada pewarnaan gram terlihat dengan warna ungu, tidak menunjukkan adanya gelembung pada tes katalase, dan tidak menunjukkan adanya zona hambatan di sekitar disk pada tes optochin.
- d. Kontrol negatif dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) yang diambil dengan ose kemudian digoreskan pada NA lalu di inkubasi selama 18-24 jam.
- e. Kontrol positif dalam penelitian ini adalah sediaan bakteri *S. pyogenes* ditambahkan aquadest tanpa penambahan ekstrak etanol daun pandan wangi.

- f. Kadar Bunuh Minimal (KHM) pada penelitian ini adalah konsentrasi terendah dari ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. pyogenes*. Penentuan jumlah konsentrasi Kadar Bunuh Minimal (KHM) di dapatkan dari pengenceran secara seri.
- g. Kadar Bunuh Minimal (KBM) pada penelitian ini adalah konsentrasi minimal dari ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri *S. pyogenes*, ditandai dengan tidak terdapatnya pertumbuhan koloni bakteri pada medium.
- h. *Original Inokulum* (OI) adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi dan digunakan untuk mencari kategori KBM.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan

Semua alat yang digunakan dalam penelitian ini dipilih terlebih dahulu mana yang dapat disterilisasi, seperti tabung reaksi, erlenmayer, petridisk, dsb. Sterilisasi dilakukan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 18 menit.

4.7.2 Tes Identifikasi kuman

Tes yang dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri *S. pyogenes* ini adalah:

- a. Tes pewarnaan gram, yang bertujuan untuk mengetahui bakteri tersebut merupakan bakteri gram positif atau bakteri gram negatif.
- b. Tes katalase, yang bertujuan untuk membedakan bakteri *Streptococcus* dengan *Staphylococcus*

- c. Tes cakram basitrasin, yang bertujuan untuk membedakan *Streptococcus* grup A dengan grup yang lain.

a. Identifikasi Bakteri dengan Tes Pewarnaan Gram

Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin. Satu ose aquades steril diteteskan pada objek ditambah sedikit biakan bakteri yang di ambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan aquades pada gelas objek dan diratakan. Untuk sediaan cair, tidak perlu disuspensikan dengan aquades. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api. Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet, dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan di tetesi dengan lugol selama 1 menit. Kemudian sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-6 detik atau sampai warna cat luntur. Kemudian sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan ditetesi safranin selama 30 detik. Kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap. Sediaan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1000x. Hasil dari pewarnaan gram, jika sediaan tercat berwarna ungu menunjukkan bahwa bakteri ini termasuk dalam gram positif.

b. Identifikasi Bakteri dengan Tes Katalase

Gelas objek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin. Membuat sediaan pembenihan cairan bakteri pada gelas objek. Sediaan ditetesi larutan H₂O₂ 3%. Diamati ada

tidaknya gelembung udara yang terjadi. Hasil pada tes katalase negative apabila tidak terdapatnya gelembung udara yang menandakan bahwa bakteri yang digunakan merupakan bakteri *Streptococcus*.

c. Identifikasi Bakteri dengan Tes Cakram Basitrasin

Tes cakram basitrasin membedakan *Streptococcus* grup A dengan grup *Streptococcus* yang lain. Media *Blood Agar Plate* yang sebelumnya telah diinokulasikan bakteri ditenpeli cakram basitrasin. Koloni bakteri *S. pyogenes* yang bersifat β -hemolitik akan menghasilkan zona inhibisi di sekitar cakram di area plate tampak translusen.

4.7.3 Persiapan Suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes*

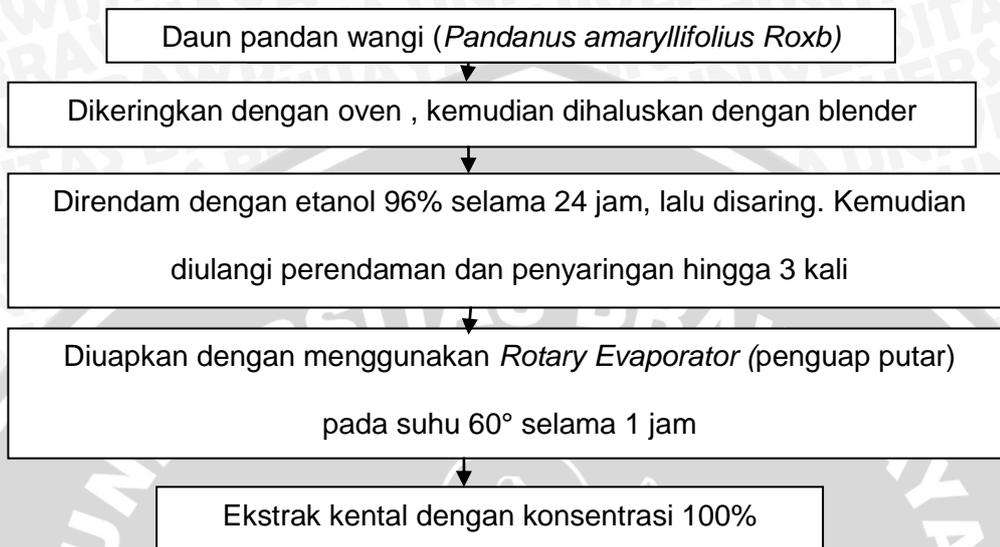
Penggunaan stok bakteri *S. pyogenes* dalam penelitian ini adalah dengan cara membuat suspensi koloni *S. pyogenes* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan media *Nutrient Broth (NB)*. Diambil 5 koloni ($d \geq 1\text{mm}$) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NA. Kemudian diukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada α maksimal = 625 nm. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung 1×10^8 CFU/mL dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$. Untuk mendapat suspensi sel yang mengandung $0,5 \times 10^8$ hingga $2,5 \times 10^8$ CFU/mL dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^8 CFU/mL) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi 10^7 CFU/mL. Proses dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi kuman yang digunakan untuk tes, yaitu $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/mL.

4.7.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*)

Pengujian daun pandan wangi didahului dengan mendeterminasi daun pandan wangi di Fakultas Biologi Universitas brawijaya. Hasilnya telah diketahui bahwa daun pandan wangi yang digunakan adalah benar daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*)

Daun pandan wangi dikumpulkan sebanyak 500 gram, dicuci bersih dan dikeringkan dengan oven Daun pandan wangi yang telah kering kemudian dihaluskan dengan blender sehingga menjadi serbuk. Serbuk kemudian direndam dengan etanol 96% sampai seluruh bagian terendam selama 24 jam, lalu disaring dengan corong *buchner* hingga didapatkan filtrat yang terpisah dari ampasnya. Ampas kemudian direndam kembali dengan etanol 96% sampai seluruh ampas terendam selama 24 jam, lalu disaring kembali dengan corong *buchner*. Pengungan perendaman dan penyaringan ini, dilakukan sebanyak 3 kali. Pada perendaman ketiga, banyak etanol 96% yang digunakan juga sama, hingga semua bagian terendam dan direndam selama 24 jam. Selanjutnya filtrat penyaringan ke 3 ini, etanol 96% nya diuapkan dengan menggunakan *Rotary Evaporator* (penguap putar) pada suhu 60° selama 1 jam hingga menjadi ekstrak kental dengan konsentrasi 100%. Ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) ini kemudian dimasukkan ke dalam botol steril, tutup rapat, dan disimpan ditempat yang sejuk.

Skema pembuatan ekstrak etanol daun pandan wangi adalah sebagai berikut



Gambar 4.7.4 Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb)

4.7.5 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*

- Disediakan 7 tabung steril, 5 tabung sebagai uji antibakteri dan 1 tabung sebagai kontrol kuman (kontrol positif), dan 1 tabung sebagai kontrol bahan (kontrol negatif).
- Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi didapatkan dari hasil pengenceran seri yaitu dengan cara perbandingan antara volume dekok dengan aquadest.
- Pengenceran seri :
 - Tabung 1 diisi ekstrak etanol daun pandan wangi dengan konsentrasi 17% yang didapat dari 0,17 ml ekstrak bahan ditambahkan 0,83 ml aquadest.
 - Tabung 2 diisi ekstrak etanol daun pandan wangi dengan konsentrasi 19%

yang didapat dari 0,19 ml ekstrak bahan ditambahkan 0,81 ml aquadest.

Tabung 3 diisi ekstrak etanol daun pandan wangi dengan konsentrasi 21%

yang didapat dari 0,21 ml ekstrak bahan ditambahkan 0,79 ml aquadest.

Tabung 4 diisi ekstrak etanol daun pandan wangi dengan konsentrasi 23%

yang didapat dari 0,23 ml ekstrak bahan ditambahkan 0,77 ml aquadest.

Tabung 5 diisi ekstrak etanol daun pandan wangi dengan konsentrasi 25%

yang didapat dari 0,25 ml ekstrak bahan ditambahkan 0,75 ml aquadest.

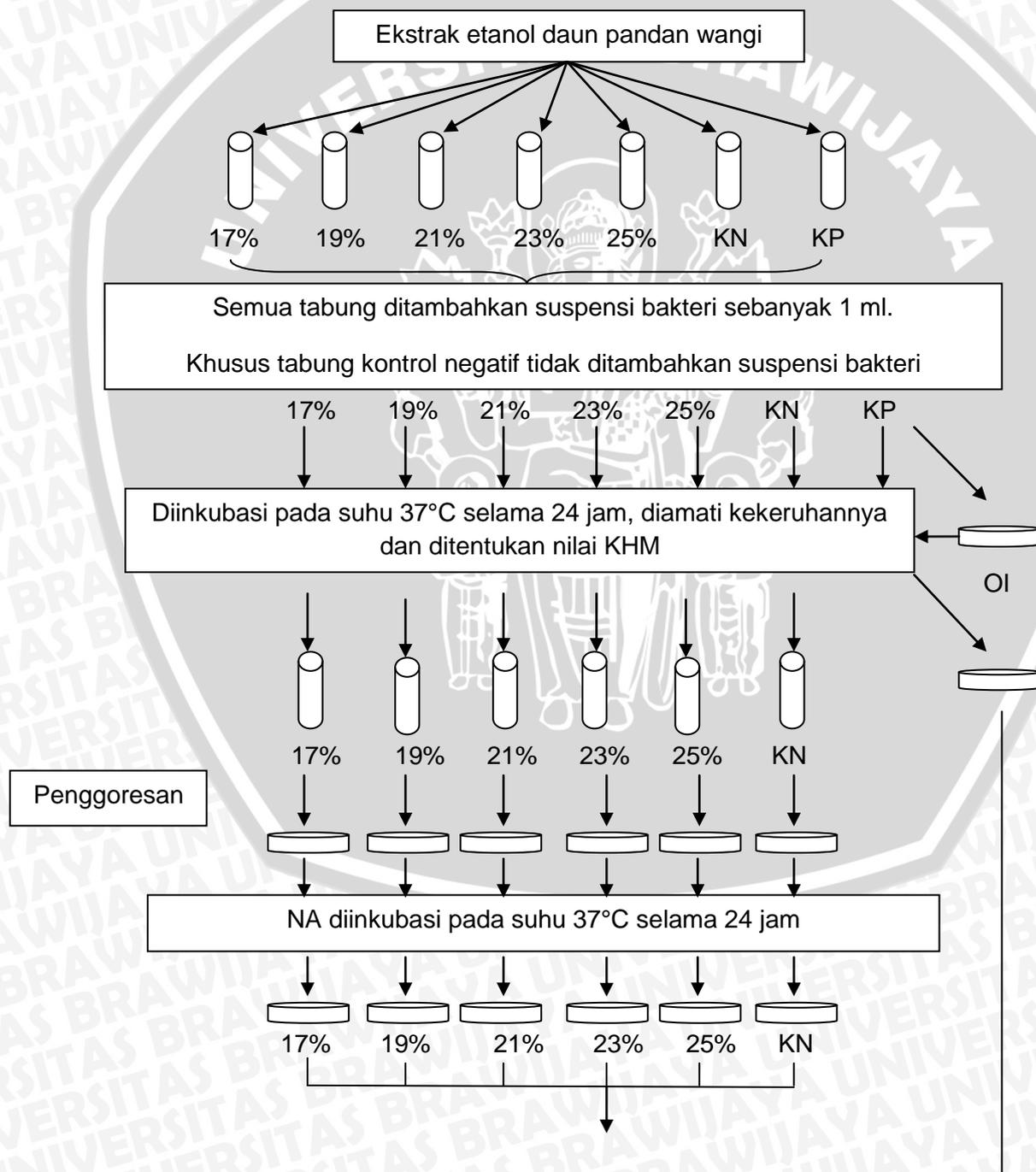
Tabung 6 diisi bakteri *S. pyogenes* ditambahkan aquadest tanpa penambahan ekstrak etanol pandan wangi (kontrol positif). Tabung 7 diisi

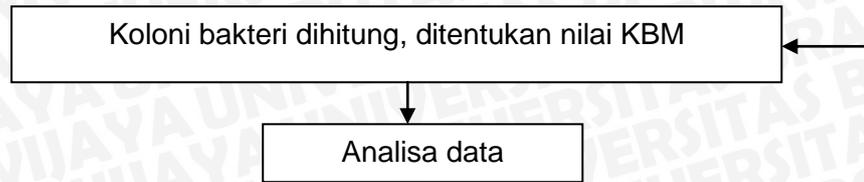
ekstrak etanol pandan wangi dengan konsentrasi 100% sebanyak 1 ml tanpa bakteri *S. pyogenes* (kontrol negatif).

- d. Setelah pengenceran seri selesai, dimasukkan 1 ml inokulum standart (MC Farland 0,5) (bakteri *S. pyogenes*) pada tabung no 1-5
- e. Kontrol kuman (0%) digoreskan pada media NA (*Nutrient Agar*) sebagai *Original Inoculum*, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- f. Masing-masing tabung di-vortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- g. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM (Kadar Hambat Minimal) didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung dibantu dengan latar belakang berupa 5 garis hitam yang berbeda ketebalannya.
- h. Selanjutnya dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose, lalu diinokulasikan pada media NA. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- i. Pada hari ketiga, data KBM (Kadar Bunuh Minimal) didapatkan dan pada masing-masing konsentrasi dilakukan pengamatan kuantitatif dengan cara

menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*. KBM ditentukan dengan tidak adanya jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media NA atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di *Original Inoculum* (OI).

4.7.6 Kerangka operasional penelitian





Gambar 4.7.6 Kerangka Operasional Penelitian

Keterangan gambar:

KP =Kontrol positif (bakteri *S. pyogenes* ditambahkan aquadest, tanpa penambahan ekstrak etanol daun pandan wangi)

KN =Kontrol negatif (ekstrak etanol daun pandan wangi tanpa penambahan bakteri *S. pyogenes*)

4.8 Analisis Data

Analisis data menggunakan uji statistic *one-way Anova* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) terhadap jumlah koloni bakteri *S. pyogenes*. Uji statistic *one-way Anova* memiliki 2 syarat yaitu data terdistribusi normal dan homogen. Uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) terhadap pertumbuhan bakteri *S. pyogenes*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 12.0. (Maulidi, 2011).